

# **Hvorfor er noen pasienter med ekstrem overvekt beskyttet mot utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes?**

*Studier av fettsyre- og glukosemetabolisme i humane myotuber fra normalvektige, ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse og ekstremt overvektige med type 2-diabetes*

Lisbeth Damlien

**Masteroppgave for graden Master i Farmasi**



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt,

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2011

# Hvorfor er noen pasienter med ekstrem overvekt beskyttet mot utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes?

*Studier av fettsyre- og glukosemetabolisme i humane myotuber fra normalvektige, ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse og ekstremt overvektige med type 2-diabetes*

Lisbeth Damlien

**Masteroppgave for graden Master i Farmasi**



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt,  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

Veiledere

Professor G. Hege Thoresen

Professor Arild C. Rustan

Førsteamanuensis Vigdis Aas

## Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo i perioden august 2010 til mai 2011. Deler av prosjektet ble presentert i en poster på Farmakologisk vintermøte på Beitostølen 27.- 30. januar 2011. Et sammendrag av posteren ble trykket i Toksikologen Nr. 1, april 2011, Årgang 21.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til mine veiledere, professor G. Hege Thoresen, professor Arild C. Rustan og Førsteamanuensis Vigdis Aas for veldig god oppfølging, rådgiving og støtte gjennom hele masteroppgaven. Takk for alle innspill, smittende engasjement og gode ideer både i laboratoriearbeidet og i skriveprosessen. En stor takk rettes også til stipendiat Siril S. Bakke for å ha besvart små og store spørsmål og for å ha hjulpet meg med små og store praktiske problemer i arbeidet på laboratoriene. Stor takk til avdelingsingeniør Camilla Stensrud for uvurderlig hjelp på de ulike laboratoriene, hjelp med western-kjøring og for hjelp til å holde humøret oppe når alt ikke gikk helt som det skulle. Jeg ønsker også å takke resten av medlemmene av "Muskelbunten" for lærerike og interessante møter.

Jeg vil takke Ingeborg, Line og Ingveig for gode faglige diskusjoner, hjelp til store og små problemer på laboratorier og lesesal, hyggelige lunsjpauser samt oppmuntring og godt vennskap gjennom året. Jeg vil også takke resten av gjengen i hjørnet av lesesalen for en kjempe hyggelig tid sammen. Jeg vil takke hele 4. etasje for at dere har skapt et hyggelig arbeidsmiljø.

Takk til min familie for at dere har støttet og motivert meg under hele studiet.

Jeg vil til slutt, men ikke minst sende en stor takk til min kjære Marius. Takk for at du har vært så tålmodig gjennom denne tiden og takk for all støtte, motivasjon og kjærlighet du har gitt meg.

Blindern mai 2011

Lisbeth Damlien

# Innhold

<b>FORORD .....</b>	<b>3</b>
<b>INNHold .....</b>	<b>4</b>
<b>SUMMARY IN ENGLISH.....</b>	<b>7</b>
<b>SAMMENDRAG.....</b>	<b>8</b>
<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>9</b>
<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>11</b>
1.1 OVERVEKT OG FEDME .....	11
1.2 DIABETES MELLITUS .....	12
1.2.1 <i>Insulinresistens i skjelettmuskel</i> .....	13
1.3 GLUKOSEMETABOLISME I SKJELETTMUSKEL.....	16
1.4 FETTSYREMETABOLISME I SKJELETTMUSKEL.....	18
1.5 METABOLSK FLEKSIBILITET .....	19
1.6 SKJELETTMUSKELCELLER <i>IN VITRO</i> .....	21
1.7 SUBSTANSER BRUKT TIL BEHANDLING AV MYOTUBENE.....	21
1.7.1 <i>Oljesyre</i> .....	21
1.7.2 <i>Eikosapentaensyre</i> .....	21
1.7.3 <i>Glukose</i> .....	22
1.7.4 <i>Karbonylcyanid p-trifluormetoksyfenylhydrazon</i> .....	22
1.8 FORMÅL MED OPPGAVEN.....	24
<b>2. MATERIALER OG METODE.....</b>	<b>25</b>
2.1 MATERIALER .....	25
2.2 DONORKARAKTERISTIKA .....	26

---

2.3	OPPRETTELSE AV CELLEBANK .....	27
2.3.1	<i>Isolering av muskelceller</i> .....	27
2.3.2	<i>Nedfrysning av celler</i> .....	28
2.3.3	<i>Oppskalering</i> .....	29
2.4	CELLEDYRKING .....	29
2.4.1	<i>Utsåing av satellittceller</i> .....	29
2.4.2	<i>Differensiering til myotuber</i> .....	29
2.5	"MULTIWELL FUEL HANDLING" .....	30
2.5.1	<i>Substratoksidasjonsforsøk med radioaktiv oljesyre, glukose og D-deoksyglukose</i> .....	31
2.5.2	<i>Proteinmåling</i> .....	32
2.6	REVERS TRANSKRIPTASE-REAL-TIME-POLYMERASE KJEDEREAKSJON .....	32
2.6.1	<i>Høsting av celler og isolering av mRNA</i> .....	33
2.6.2	<i>cDNA-syntese</i> .....	33
2.6.3	<i>RT-Real time-PCR</i> .....	34
2.7	IMMUNOBLOTTING (WESTERNBLOTTING) .....	35
2.7.1	<i>Høsting av celler</i> .....	35
2.7.2	<i>Proteinmåling</i> .....	36
2.7.3	<i>Gelelektroferese</i> .....	36
2.7.4	<i>Blotting</i> .....	36
2.7.5	<i>Deteksjon og kvantifisering</i> .....	37
2.8	STATISTISKE ANALYSER .....	38
3.	<b>RESULTATER</b> .....	<b>39</b>
3.1	DONORKARAKTERISTIKA .....	39
3.2	MYOTUBENES METABOLISKE KAPASITET .....	39

---

3.2.1	<i>Fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak, og effekt av forbehandling med ulike fettsyrer</i>	39
3.2.2	<i>Adapterbarhet</i> .....	40
3.2.3	<i>Suppressibilitet</i> .....	42
3.2.4	<i>Substratregulert fleksibilitet</i> .....	44
3.2.5	<i>Effekt av kronisk høy glukose på myotubenes fettsyreoksidasjon, fettsyreopptak og metabolske fleksibilitet</i> .....	46
3.2.6	<i>Glukoseoksidasjon og glukoseopptak, og effekter av insulin</i> .....	48
3.2.7	<i>Effekt av akutt tilstedeværelse av fettsyre på glukoseoksidasjon og glukoseopptak</i> ...	49
3.3	GENUTTRYKK AV CPT 1B OG CD36 OG EFFEKT AV FORBEHANDLING MED EPA.....	51
3.4	DETEKSJON AV FOSFORYLERT AKT VED HJELP AV WESTERNBLOTTING.....	53
3.5	KORRELASJONSANALYSE .....	54
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>56</b>
4.1	KLASSIFISERING OG KARAKTERISERING AV DONORER .....	56
4.2	FETTSYREMETABOLISME .....	58
4.3	GLUKOSEMETABOLISME.....	60
4.4	METABOLSK FLEKSIBILITET .....	61
<b>5.</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>64</b>
	<b>KILDELISTE</b> .....	<b>65</b>
	<b>APPENDIKS</b> .....	<b>69</b>

## Summary in English

*Introduction:* Insulin resistance and type 2 diabetes are strongly associated with overweight and obesity. About 80 % of patients with type 2 diabetes are overweight or obese.

Surprisingly, only about 30 % of the morbid obese patients undergoing bariatric surgery at the Center for Morbid Obesity in Vestfold Trust Hospital were found to suffer from type 2 diabetes. Therefore, this question was raised: Why are some patients with morbid obesity protected against the evolvement of insulin resistance and type 2 diabetes?

*Methods:* Satellite cells isolated from skeletal muscle biopsies from morbid obese (normal glucose tolerant or type 2 diabetic) and lean donors were proliferated and differentiated into multinucleated myotubes. Fatty acid and glucose metabolism was studied using an established substrate oxidation-method with radiolabelled substrates. Parameters of metabolic flexibility were calculated from these results. RT-Real-time-PCR was used to investigate mRNA-expression of CPT 1B and CD36. Phosphorylated Akt/PKB was investigated by SDS-PAGE and immuno-blotting.

*Results:* The results indicated an obesity-effect on fatty acid and glucose metabolism. Myotubes from the two morbid obese groups have a higher uptake and oxidation of fatty acids and glucose, compared to myotubes from the lean donors. Cells from the lean donors seemed to have higher metabolic flexibility than cells from the morbid obese donors. Pre-treatment with eicosapentaenoic acid (EPA) seemed to increase the metabolic flexibility in all three donor groups, indicating a positive role of  $\omega$ -3 fatty acids in counteracting metabolic inflexibility independent on donor group.

*Discussion and Conclusion:* The results in this thesis show differences in metabolism and flexibility between the myotubes from the two morbid obese donor groups compared to the lean donors *in vitro*. This indicates that the morbid obesity can be the result of genetic differences or has lead to epigenetic changes in the myotubes. Therefore there might be possible to reveal some differences between the two morbid obese donor groups and thereby come closer to which qualities that protects some patients with morbid obesity against the evolvement of insulin resistance and type 2 diabetes.

## Sammendrag

*Introduksjon:* Utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes er sterkt assosiert med overvekt og fedme. Ca 80 % av pasienter med type 2-diabetes er klassifisert som overvektige. Overraskende nok hadde kun ca 30 % av pasientene, som var kvalifisert for bariatrisk kirurgi ved Senter for sykelig overvekt ved sykehuset i Tønsberg, etablert type 2-diabetes. Vi stilte oss dermed spørsmålet: hvorfor er noen pasienter med ekstrem overvekt beskyttet mot utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes?

*Metode:* Muskelceller fra ekstremt overvektige (med normal glukosetoleranse eller etablert type 2-diabetes) og normalvektige donorer ble dyrket og differensiert til flerkjernede myotuber i kultur ved hjelp av en etablert metode. Fettsyre- og glukosemetabolisme ble undersøkt ved hjelp av substratoksidasjonsforsøk ved bruk av radioaktive isotoper, og metabolsk fleksibilitets-parametere ble beregnet på bakgrunn av resultatene fra disse forsøkene. mRNA-ekspresjon av CPT 1B og CD36 ble undersøkt ved hjelp av RT-real-time-PCR og fosforylert AKT/PKB ble undersøkt ved hjelp av Westernblotting.

*Resultater:* Myotubene fra de ekstremt overvektige donorene hadde høyere fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon, men lavere metabolsk fleksibilitet enn myotubene fra de normalvektige kontrollene. Det samme mønsteret ble observert for glukoseopptak og glukoseoksidasjon. Hovedforskjellene som ble funnet i denne oppgaven så ut til å være fedmerelaterte. EPA så ut til å øke metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskelcellene fra alle tre donorgrupper, noe som indikerer en positiv effekt av  $\omega$ -3-fettsyrer i forhold til å motvirke metabolsk infleksibilitet.

*Diskusjon og konklusjon:* Resultatene presentert i denne oppgaven viste klare forskjeller i metabolisme og fleksibilitet hos myotuber fra de to gruppene med ekstremt overvektige donorer sammenlignet med myotuber fra normalvektige donorer. De forskjellene som ble presentert tyder på at myotubene fra de to ekstremt overvektige donorgruppene bærer med seg en endring, epigenetisk eller genetisk, som fører til at de bevarer noen av *in vivo*-egenskapene når de dyrkes *in vitro*. Det kan derfor være mulig å finne forskjeller mellom myotubene fra de to ekstremt overvektige donorgruppene slik at man kan få bedre innsyn i hva som beskytter noen pasienter med ekstrem overvekt mot utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes.



## Forkortelser

36B4 -syreholdig ribosomal fosfoprotein P0  
ACC -acetyl CoA karboksylase  
ADP -adenosindifosfat  
ASM -syreløselige metabolitter  
ATP -adenosintrifosfat  
BCA -bicinchoninic-syre  
BSA -bovint serum albumin  
CA -celleassosiert  
CD36 -“cluster of differentiation 36”  
cDNA -komplementært deoksyribonukleinsyre  
Ci -Curie  
CO<sub>2</sub> -karbondioksid  
CoA -coenzym A  
CPT 1B -carnitin palmitoyltransferase B (muskel)  
DAG -diacylglycerol  
DEPC-dH<sub>2</sub>O -dietylpyrokarbonat i destillert vann  
DMSO -dimetylsulfoksid  
DNA -deoksyribonukleinsyre  
DOG -D-deoksyglukose  
ECL -forbedret kjemoluminescens  
EO -ekstremt overvektig  
EPA -eikosapentaensyre  
ETC -elektrontransportkjeden  
FAD -flavinadenindinukleotid  
FADH -redusert form av FAD  
FAT/CD36 -fettsyretransporter/Cluster of Differentiation 36  
FATP -fettsyretransporterende protein  
FBS -fetal bovin serum  
FCCP - karbonylcyanid p-trifluormetoksyfenylhydrazon  
FFA -frie fettsyrer  
GAPDH -glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase  
GLUT1 -glukosetransportør 1  
GLUT4 -glukosetransportør 4  
HBSS -Hanks bufrede saltløsning  
HDL -høy tetthets-lipoprotein  
HRP -pepperrot-peroksidase  
IL-6 -interleukin 6  
IR -insulinresistens  
KMI -kroppsmasseindeks  
LD -lipiddråper  
LDL -lav tetthets-lipoprotein  
mRNA -“messenger” ribonukleinsyre  
MUFA -enumettet fettsyre  
NGT -normal glukosetoleranse  
NV -normalvektig

---

O<sub>2</sub> -oksygen  
OA -oljesyre  
OXPHOS -oksidativ fosforylering  
PBS -fosfatbufret salin (fysiologisk saltvann)  
PDH -pyruvat-dehydrogenase  
PGC1 -PPAR-koaktivator 1  
PI3K -fosfoinositide-3-kinase  
PIP<sub>2/3</sub> -fosfatidylinoditol-4,5-bisfosfat/ fosfatidylinoditol-3,4,5-trisfosfat  
PKB -proteinkinase B (Akt)  
PKC -proteinkinase C  
PL -fosfolipider  
PPAR -Peroksisom-proliferasjons-aktivert-reseptor  
PUFA -flerumettet fettsyre  
RNA -ribonukleinsyre  
RPM -omdreininger per minutt  
RQ -respiratorisk kvotient  
RT-real-time-PCR -reverstranskriptase-real-time-polymerase kjedereaksjon  
SDS -natrium-dodecyl-sulfate  
SH2 -Src homology 2  
SkGM -skjelettmuskelcelle-vekstmedium  
T1D -type 1-diabetes  
T2D -type 2-diabetes  
TAG -triacylglyserol  
TCA -tricarbonsyresyklus (krebssyklus)  
TGS -tris/glycin/SDS  
TNF $\alpha$  -tumornekrosefaktor  $\alpha$   
T-TBS -trisbufret salin med tween 20  
WHO -verdens helseorganisasjon

# 1. Innledning

## 1.1 Overvekt og fedme

WHO benytter kroppsmasseindeks (KMI; body mass index) som mål for å klassifisere overvekt og fedme hos voksne, hos barn benyttes et annet system hvor også alder og kjønn tas med i beregningen. KMI beregnes som kilogram kroppsvekt per kvadratet av personens høyde i meter ( $\text{kg/m}^2$ ) [1] (Tablett 1.1).

<b>Kroppsmasseindeks (KMI)-klassifisering</b>	
<b>Klassifisering</b>	<b>Verdi (<math>\text{kg/m}^2</math>)</b>
Undervekt	< 18,5
Normalvekt	18,5 -24,9
Overvekt (prefedme)	25,0 -29,9
Fedme klasse I	30,0 -34,9
Fedme klasse II	35,0 -39,9
Fedme klasse III (Ekstremt overvektige)	$\geq 40,0$

**Tablett 1.1 WHO klassifisering av fedme og overvekt med utgangspunkt i KMI.** Donorene benyttet i denne oppgaven befinner seg enten i klassene Normalvekt og Overvekt, for enkelhets skyld kalles disse videre normalvektige kontroller eller i Fedme klasse III, videre i oppgaven omtales disse som ekstremt overvektige med type 2-diabetes (EO-T2D) eller ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT). Modifisert fra [2].

WHO anslo at det i 2008 var 1,5 milliarder overvektige individer eldre enn 20 år på verdensbasis, hvorav ca 500 millioner var rammet av fedme. I 2010 fantes det nærmere 43 millioner barn (under 5 år) med overvekt [1]. Overvekt og fedme skyldes i utgangspunktet en ubalanse mellom energiinntak og energiforbruk. Dette har sammenheng med overforbruk av et energitett kosthold og manglende fysisk aktivitet [3, 4]. Fedme og diabetes omtales som tvillingepidemien og man utpeker visceral fedme til å ha en nøkkelrolle i utviklingen av insulinresistens (IR) og type 2-diabetes (T2D) (se 1.2.1). 80 % av pasienter som blir diagnostisert med T2D er overvektige [5]. Flere studier viser at høykaloridiett og fysisk inaktivitet fører til fedme [6, 7], det er derfor klart at miljø og livsstil spiller en viktig rolle i utviklingen av fedme. Samtidig kan man ikke utelukke at arv også spiller en rolle i denne

utviklingen. Det er i dag kjent at visceralt fettvev som tidligere ble sett på som metabolsk inaktivt, er svært aktivt og sterkt relatert til insulinsensitivitet. Adipocytter fra visceralt fettvev er veldig forskjellig fra adipocytter i annet fettvev, de er store, insulinresistente og betente [8]. Ved overvekt og fedme blir det mer av det viscerale fettvevet (abdominalt) og i en tilstand med kronisk energioverskudd vil adipocytterne overbelastes. Dette vil resultere i ukontrollert lipolyse i adipocytter som igjen fører til økte plasmakonsentrasjonsnivåer av ikke-esterifiserte frie fettsyrer og cytokiner [4, 9]. Økt plasmakonsentrasjonsnivå av frie fettsyrer fører til økt intracellulær lagring i annet vev enn fettvev (se insulinresistens). Det er observert økte nivåer av cytokiner som resistin, leptin, tumornekrose-faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) og interleukin-6 (IL-6) i overvektige og individer med T2D [8], disse proinflammasjonsfaktorene er mistenkt for å ha betydning for utvikling av metabolske og kardiovaskulære sykdommer [9]. Risikoen for å utvikle følgesykdommer som diabetes, hypertensjon og kardiovaskulære sykdommer øker i takt med overvekten [4].

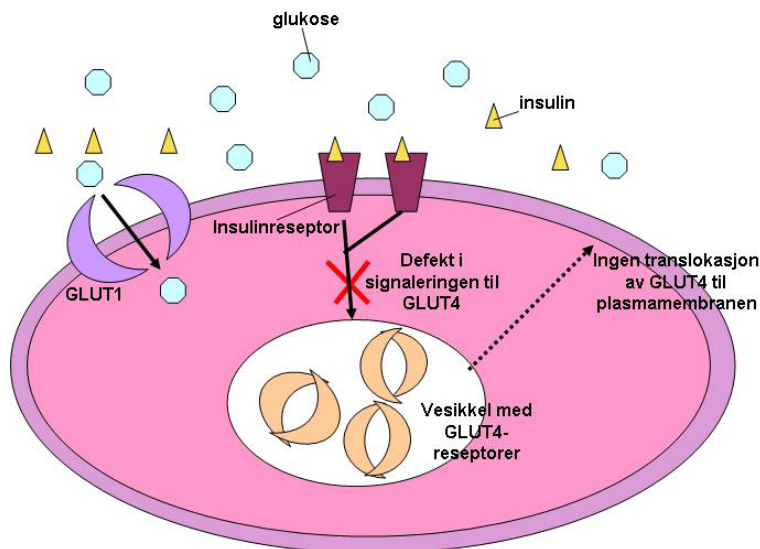
## 1.2 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus kan grovt sett deles opp i type 1-diabetes mellitus (T1D) og type 2-diabetes mellitus (T2D) [10] hvorav sistnevnte er den mest utbredte formen. T2D står for 85-95 % av diabetestilfellene i høyinntektsland mens prosentandelen antakelig er enda høyere i lav- og middelsinntektsland [11]. T1D skyldes vanligvis en autoimmun ødeleggelse av de insulinproduserende  $\beta$ -cellene i bukspyttkjertelen og kjennetegnes av hyperglykemi og akutt insulinmangel. Klinisk debut av sykdommen er ofte akutt og forekommer vanligvis før 30 år [10]. T2D er assosiert med hyperglykemi som følge av insulinresistens (IR), hyperinsulinemi som kompensasjon for hyperglykemi, forstyrret fettsyreoksidasjon og akkumulering av triacylglyserol (TAG) i skjelettmuskelfibre. [12-14]. T2D er ofte et ledd i et insulinresistenssyndrom med abdominal (visceral) fedme, høyt blodtrykk, høye TAG, lavt HDL-kolesterol og økt tendens til aterosklerose [10], også kalt metabolsk syndrom [15]. De siste tiårene har forekomsten av T2D økt drastisk og sykdommen har blitt en stor trussel mot folkehelsen over hele verden. T2D har, ettersom lidelsens prevalens har økt, utviklet seg til en av hovedrisikofaktorene for utvikling av kardiovaskulære -komplikasjoner, nyresvikt, tap av syn og amputasjoner [16]. Det internasjonale diabetesforbundet (International Diabetes Federation) [11] anslo at det i 2010 var 285 millioner mennesker (mellom 20 og 79 år) med

diabetes på verdensbasis. Forbundet anslår at antallet vil stige til 438 millioner innen år 2030. En andel av denne økningen kan tilskrives den økende alderen i befolkningen, ettersom prevalensen av type 2-diabetes øker med økende alder. Livsstilsendringer spiller i midlertidig den viktigste rollen i den økte risikoen for å utvikle diabetes [16]. T2D eller ikke-insulinavhengig diabetes mellitus [17] som sykdommen også kalles er fenotypisk heterogen og kan derfor ikke forklares med en enkelt patofysiologisk mekanisme [18]. Det er i midlertidig vist genetiske endringer hos normalvektige slektninger av pasienter med T2D, noe som kan tyde på at en arvelig sårbarhet kan gjør noen individer mer utsatt for å utvikle T2D [18].

### 1.2.1 Insulinresistens i skjelettmuskel

I en normalsituasjon øker glukoseopptaket i skjelettmuskel, fettvev og lever som respons på frigitt insulin i forbindelse med måltid, samtidig hemmes glukoseproduksjonen i lever. Dette sørger for at plasmakonsentrasjonen av glukose holdes stabil [19]. Skjelettmuskel utgjør omtrent halvparten av vekten til et menneske og står for ca 80 % av det insulinstimulerte glukoseopptaket i kroppen. En forstyrrelse i skjelettmuskelens metabolisme vil dermed forstyrre homeostasen i hele kroppen [14]. IR innebærer at insulinsignalet ikke formidles på en adekvat måte i skjelettmuskel, fettvev og lever (figur 1.1). Plasmakonsentrasjonen av glukose vil forbli høy til tross for tilnærmet normal insulinproduksjon [20]. I de aller fleste tilfeller skyldes dette ikke mangel på insulinreseptorer eller GLUT4-transportører (se 1.3), men at insulinsignalet ikke forsterkes kraftig nok inne i cellen [14, 21]. I tillegg til redusert transport av glukose inn i cellen, blir glukoseoksidasjon og glykogensyntese også hemmet ved IR [13]. Insulinproduserende  $\beta$ -cellene i pankreas forsøker å kompensere for hyperglykemien ved å produsere og frigjøre større mengder insulin enn normalt, dette resulterer i hyperinsulinemi en periode [19, 22] (Figur 1.2). Dersom begynnende T2D ikke behandles vil  $\beta$ -cellene gradvis ødelegges og mangel på insulin blir en medvirkende faktor til videre hyperglykemi [18, 22]. Både perifer IR i skjelettmuskel og nedsatt insulinutskillelse fra bukspyttkjertelen bidrar til hyperglykemi i T2D. Samtidig kan hyperglykemien føre til ytterligere nedsatt insulinsensitivitet og  $\beta$ -celle-funksjon [18].



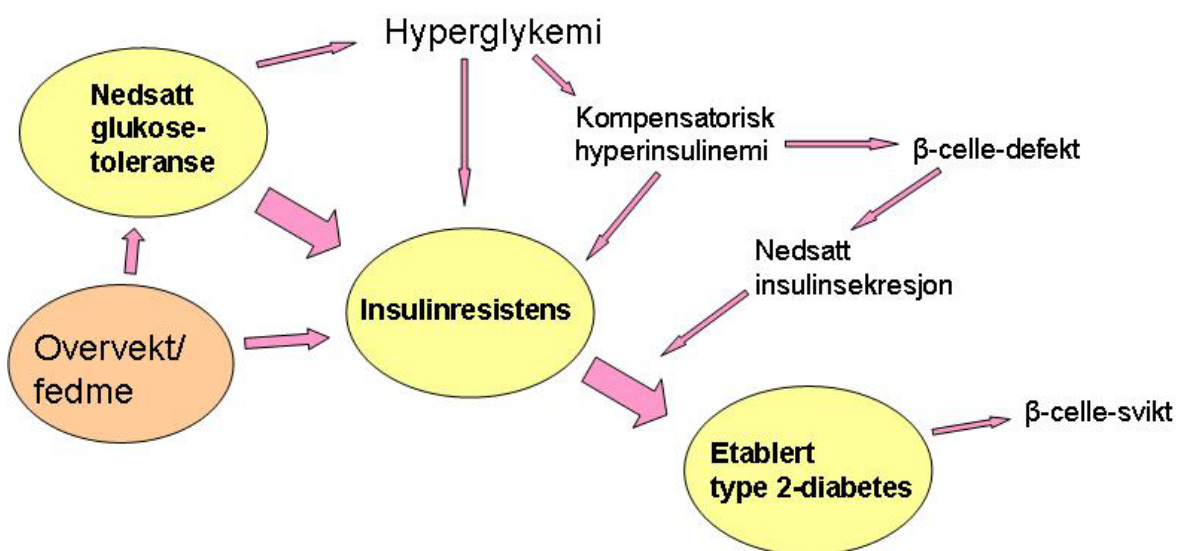
**Figur 1.1 Insulinresistens** Ved insulinresistens formidles ikke insulinsignalet formidles ikke adekvat intracellulært og dette fører via flere trinn til at GLUT4 ikke translokteres til plasmamembranen. Dermed reduseres glukoseopptaket i cellen. GLUT1; insulinuavhengig transportør av glukose, GLUT4; insulinavhengig transportør av glukose. Modifisert fra [23]

Overvekt og fedme er assosiert med økt plasmakonsentrasjon av fettsyrer, økt ekstra- og intracellulært fettsyreinnhold er også observert hos individer med T2D [22, 24, 25]. Økt plasmakonsentrasjon av fett fører til fettsyreakkumulering i cytosol i andre organer enn fettvev både i dyreforsøk med høykaloridiett og etter fettinfusjon [26]. Det er observert at insulinsignaler, insulinstimulert fosforylering av tyrosin i insulinreseptor og Akt/proteinkinase B (Akt) var redusert etter 48 timers behandling med fettsyre [27]. Det er blitt foreslått at IR i skjelettmuskelceller kan utvikles som en følge av intramyocellulær akkumulering av ulike fettsyreintermediater (diacylglyserol, acyl-CoA, ceramider) [5, 15-17]. Overvekt og fedme er derfor foreslått som hovedrisikofaktor for utvikling av IR [21] (Figur 1.2). Til tross for at det tilsynelatende er enighet i studier om at intracellulær fettsyreakkumulering er den viktigste parameteren i utvikling av IR, er det fortsatt stor usikkerhet rundt de molekylære mekanismene og mange intracellulære komponenter er blitt undersøkt.

Redusert mitokondriefunksjon som årsak til IR har stått sentralt i flere studier. Kelly et al. [13] fant færre mitokondrier med dårligere funksjonsevne i muskel fra individer med T2D og fedme. Videre er flere komponenter knyttet til mitokondriefunksjon undersøkt. Ritov et al. [28] fant at IR var kjennetegnet ved mangelfull funksjon i elektrontransportkjeden (ETC) og en ubalanse mellom  $\beta$ -oksidasjon, krebssyklus og ETC. He et al. [29] fant økt intracellulært innhold av fettsyrer i muskel fra overvektige og individer med T2D og mente dette var en

følge av reduksjon i aktiviteten til oksidative-enzymmer knyttet til mitokondriefunksjon. Rasmussen et al. avslørte redusert acyl-CoA-transport via carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1) inn i mitokondriene *in vivo* i normalvektige individer med simulert hyperglykemi og hyperinsulinemi [30]. Hancock et al. [6] fant imidlertid økt mitokondrieaktivitet i forsøksdyr med IR etter høyfettdiett. De fant også økte nivåer av transkripsjonsfaktorene peroksisom-proliferasjons-aktivert-reseptor (PPAR) og PPAR-koaktivator 1 (PGC1) som er sett på som nøkkelelementer i reguleringen av mitokondriell biogenese. Det er vanskelig å si noe om årsak-effekt-forholdet mellom IR og mitokondriefunksjon ettersom resultater fra studiene peker i ulike retninger.

Flere komponenter i den intracellulære insulinsignaleringskaskaden (Figur 1.3) er også blitt undersøkt for å kartlegge om defekter i denne kan være årsaken til IR. Fosfoinositide-3-kinase (PI3K)-signalveien ses på som en nøkkelkomponent i insulinsignaleringskaskaden. Insulinstimulert aktivering av PI3K er blitt observert redusert i muskelceller fra T2D individer [31]. Akt som er lokalisert nedstrøms for PI3K har ikke vist stabilt forandret aktivitet i overvektige og individer med T2D, det er derfor uklart hvilken rolle proteinet spiller for glukosemetabolismen og insulinsignaleringsen i en IR-situasjon [21]. Både 160 kDa Akt substrat (AS160) og proteinkinase C  $\lambda$  og  $\zeta$  (PKC  $\lambda/\zeta$ ) er også blitt undersøkt i ulike studier, og det er klart at disse komponentene har en rolle i GLUT4-translokering, men det er fortsatt uklart om de spiller en rolle i IR-utvikling [21].

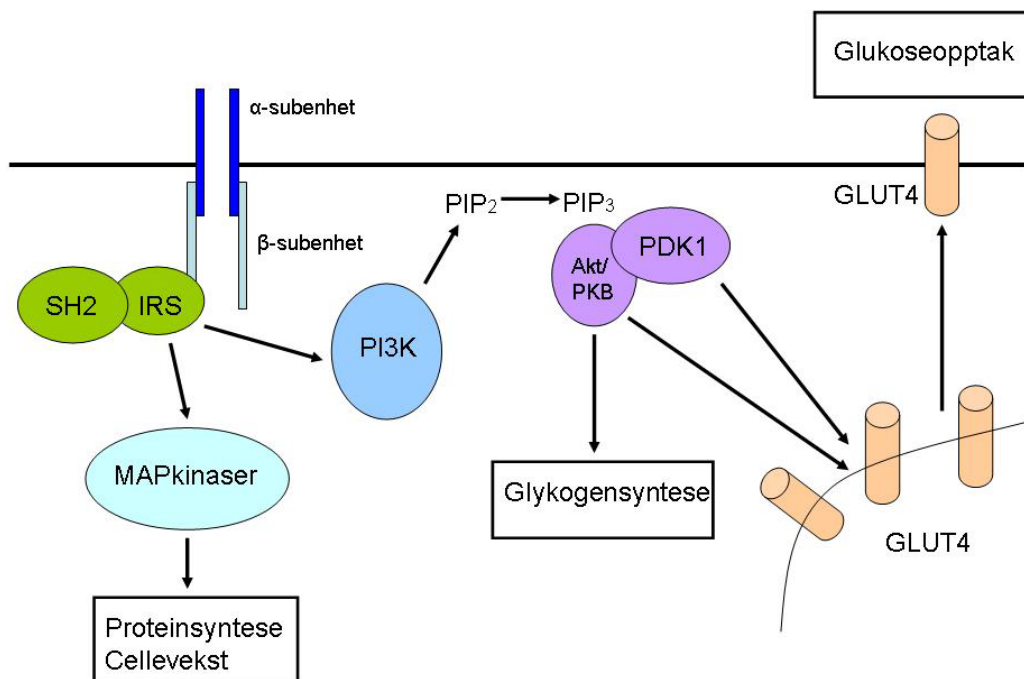


**Figur 1.2 Utvikling av type 2-diabetes** Overvekt/fedme er blitt utpekt som en av hovedrisikofaktorene for utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes.  $\beta$ -cellene i pankreas forsøker å redusere hyperglykemien ved å skille ut mer insulin, kompensatorisk hyperinsulinemi. Etter en periode vil  $\beta$ -cellene ødelegges og man vil få nedsatt insulinsekresjon, dette fører til type 2-diabetes.  $\beta$ -cellene vil etter en periode uten behandling av type 2-diabetes slutte å fungere,  $\beta$ -celle-svikt, pasienten vil nå være avhengig av insulintilførsel.

### 1.3 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Skjelettmuskelceller er avhengig av glukosetransportører for å ta opp glukose. Det mest effektive glukoseopptaket skjer som respons på insulinbinding til insulinreseptor og påfølgende intracellulær insulinsignaleringskaskade som ender i GLUT4-translokering.

Insulinreseptoren tilhører reseptor-tyrosinkinase-familien. Når insulin binder seg til insulinreseptor skjer det en autofosforylering i reseptorens  $\beta$ -subenheten, deretter bindes og fosforyleres insulinreseptorsubstrat (IRS), dette fører til binding av Src homology 2 (SH2) (Figur 1.3). Denne interaksjonen fører til aktivering av PI3K som igjen fører til aktivering av nedstrøms proteiner som fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfat ( $PIP_3$ ), Akt og 3-fosfoinositidavhengig kinase-1 (PDK-1) (Figur 1.3). Som følge av insulinsignaleringskaskaden aktiveres en rekke prosesser inne i cellen (figur 1.3).

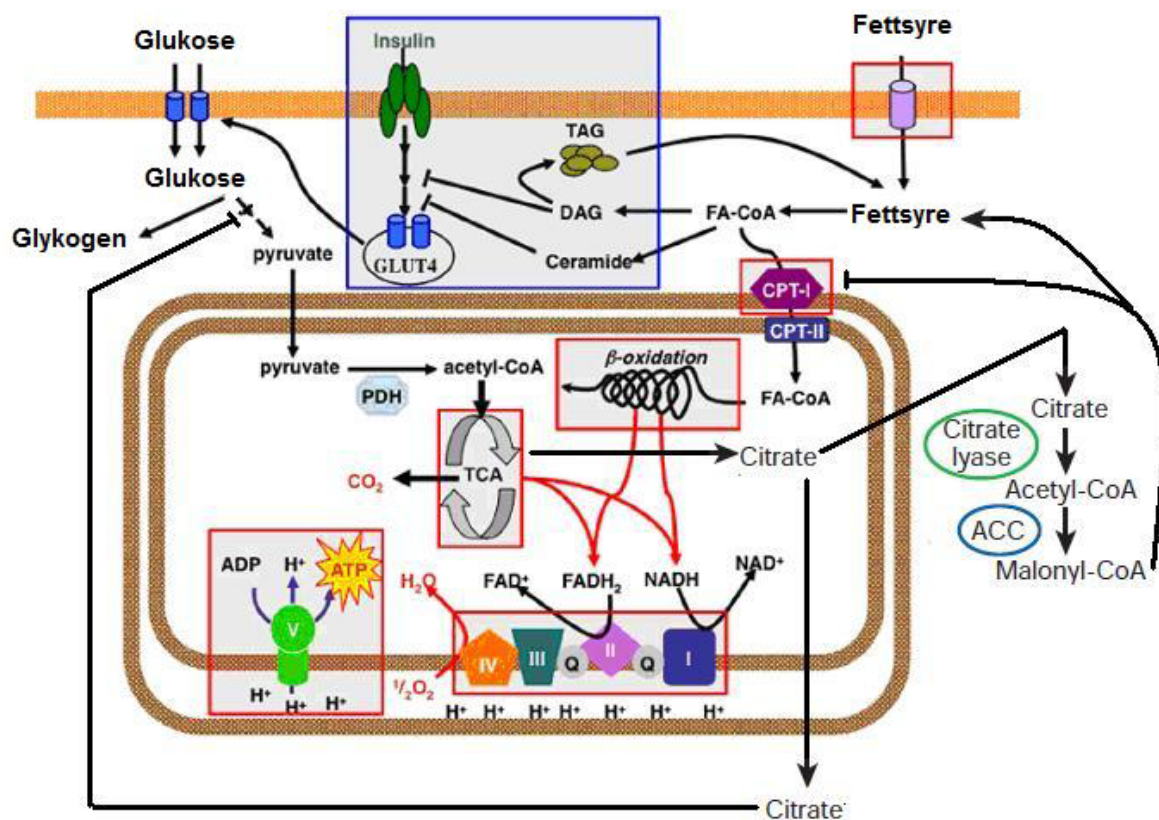


**Figur 1.3 Insulinsignaleringskaskaden** Akt/PKB; Akt/proteinkinase B, GLUT4; glukosetransportør, IRS; insulinreseptor substrat, PDK-1; 3-fosfoinositidavhengig kinase, PI3K; fosfatidylinositol 3-kinase,  $PIP_2$ ; fosfatidylinositol 4,5-bisfosfat,  $PIP_3$ ; fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfat, SH2; Src homology 2. Modifisert fra [19].

GLUT er en familie av membranproteiner og fungerer som transportører for glukose, hvorav GLUT1-4 er de best karakteriserte. GLUT1 som står for basalt glukoseopptak og GLUT4, som sørger for insulinstimulert glukoseopptak, er de viktigste transportørene representert i muskel og fettvev [19, 20]. Når insulin ikke er til stede ligger GLUT4 lagret i intracellulære vesikler. Når insulinreseptor binder insulin fører insulinsignaleringskaskaden til at GLUT4



translokteres fra de intracellulære vesiklene til cellemembranen hvor glukose kan transporteres inn i cellen [19, 20]. Inne i cellen blir glukose omdannet til Glukose-6-fosfat (Glukose-6-P). Glukose-6-P kan enten lagres i form av glykogen, via glykogenesen, eller fett, via lipogenesen, eller entre glykolysen og omdannes til pyruvat via flere trinn for deretter å entre mitokondriene for å omdannes til Acetyl-CoA for tilslutt å bli oksidert i Krebszyklus (figur 1.4). Insulinstimulering fremmer cellens glykogensyntese og glukoseoksidasjon [19, 20]. Det meste av energien som utvinnes fra glukose i cellen, utvinnes ved hjelp av elektrontransportkjeden. En kjede av reduksjons-oksidasjons(redoks)-reaksjoner fører til dannelse av energirike ATP-molekyler [26, 32] (figur 1.4).



**Figur 1.4 Opptak og oksidasjon av glukose og fettsyre.** ACC; Acetyl-CoA karboksylase, ADP; adenosin difosfat, ATP; adenosin trifosfat, CPT-I; carnitine palmitoyltransferase 1, CPT-II; carnitine palmitoyltransferase 2, DAG; diacylglycerol, FA-CoA; fettsyre-koenzym A, FAD; flavin adenindinukleotid, FADH<sub>2</sub>; redusert form av FAD, GLUT4; glukosetransportør, NAD; nicotinamid adenin dinukleotid, NADH; redusert form av NAD, TAG; triacylglycerol, TCA; tricarboxylic acid cycle (krebssyklus), PDH; Pyruvat dehydrogenase. Modifisert fra [26] og [19]

## 1.4 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel

Fettsyreopptak kan skje via en av to mekanismer, diffusjon gjennom fosfolipidlaget eller aktiv transport ved hjelp av membrantransportører. Diffusjonen er avhengig av at det er mindre fettsyrer intracellulært enn ekstracellulært, diffusjonen er dermed avhengig av aktiviteten til den intracellulære fettsyremetabolismen. Den aktive transporten ved hjelp av membrantransportører er avhengig av et visst uttrykk av transportørmolekyler som fettsyretranslokase/cluster of differentiation 36 (FAT/CD36, videre kalt CD36) og fettsyretransporterende proteiner (FATP) for at mekanismen ikke skal mettes [33]. Under fysiologiske betingelser når det meste av fettsyrene er bundet til ekstracellulære proteiner er det mest sannsynlig aktiv transport over cellemembranen som utgjør hovedvekten av opptaket til cellen [34].

Inne i cellen bindes fettsyrer enten til cytosolisk fettsyre-bindende protein (FABPc) eller blir aktivert av acyl-CoA-syntase-(ACSL)-familien eller fettsyre-transporterende protein (FATP) for å generere fettsyre-CoA (FA-CoA) (figur 1.4). FA-CoA kan videre entre mitokondriene via carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1) (figur 1.4). Aktiviteten til CPT-1 hemmes av malonyl-CoA. Inne i mitokondriene gjennomgår FA-CoA  $\beta$ -oksidasjon til Acetyl-CoA som kan entre krebssyklus for energiutvinning. Alternativt til å entre mitokondriene kan FA-CoA ved energioverskudd lagres. FA-CoA esterifiseres i flere trinn til di- eller triacylglycerol (DAG eller TAG) [26, 35] (figur 1.4). Lagring av intramuskulært fett forekommer vanligvis i lipiddråper (LD). LD er avgrenset med et enkeltlag med fosfolipider og lipiddråpe-assosierte proteiner (perilipiner) [36]. Innholdet består vanligvis av hovedsakelig TAG og kolesterylester [37]. Samlet sett ser fettsyreaktivering, binding til cytosol-proteiner og intracellulær metabolisme ut til å være drivkraften bak reguleringen av fettsyreopptaket, men det er fortsatt uklart hvordan denne reguleringen foregår [35].

Økt plasmakonsentrasjonsnivå av fettsyrer slik at skjelettmuskel eksponeres for overskudd av fettsyrer kan føre til økt intracellulær fettsyre akkumulering som igjen kan føre til utvikling av IR [13, 26, 28, 29] (Figur 1.4, blå firkant). Fettsyreakkumulering kan oppstå som følge av økt transport (for eksempel via CD36) inn i cellen og/eller redusert lipidoksidasjon i mitokondriene [27]. I muskelceller fra individer med overvekt og T2D er det observert forhøyet rate av transport av langkjedede fettsyrer inn i store vesikler intracellulært [27]. CD36 kan være det hastighetsbestemmende trinnet i fettsyreopptaket, det

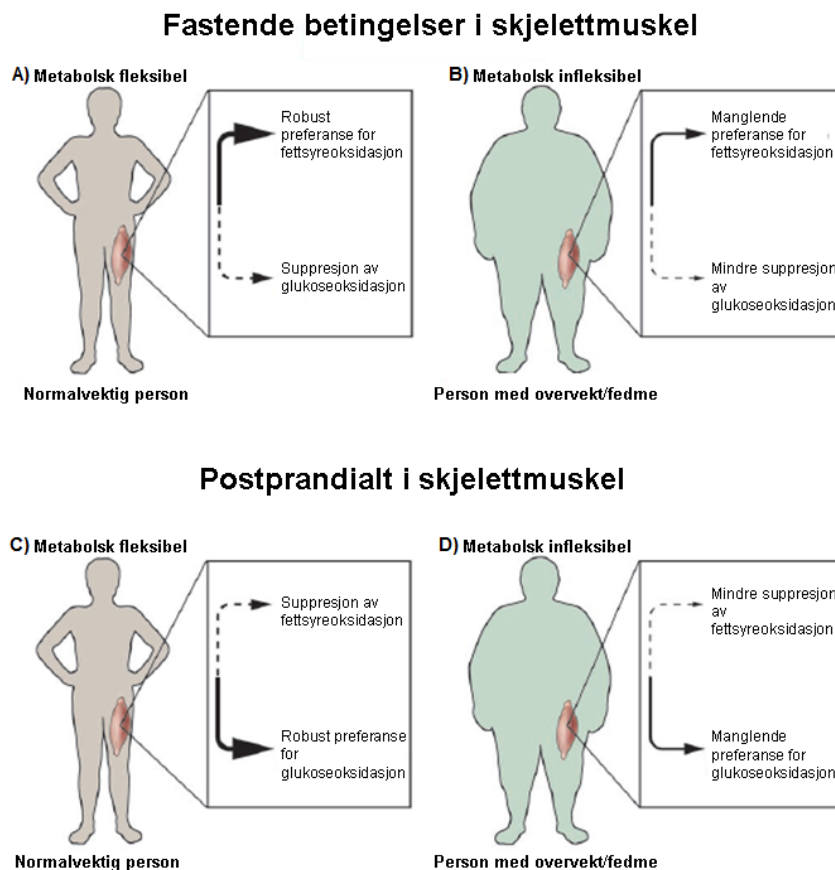
er vist at overuttrykk av CD36 fører til økt fetttsyreopptak [38] mens mus med mangelfull CD36 utvikler forhøyede plasmakonsentrasjonsnivåer av FFA [27]. Det er funnet økt opptak av fettsyrer og økt nivå av CD36 hos overvektige sammenlignet med normalvektige. Overekspresjonen av CD36 hadde imidlertid ingen nedsettende effekt på insulinfølsomheten [27]. Det er observert en signifikant høyere fetttsyrefordeling til fosfolipider, DAG og TAG hos overvektige i forhold til normalvektige [12, 27]. I tillegg er det vist en invers korrelasjon mellom intracellulær TAG og insulinfølsomhet [12].

## 1.5 Metabolsk fleksibilitet

Metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskel er beskrevet som muskelcellenes evne til å skifte mellom ulike energisubstrater [39]. Randle et al. [40] viste at eksogene fettsyrer kan redusere glukoseoksidasjon. Flere studier har vist det samme, og også *vice versa*, det vil si at hyperglykemi kan føre til nedsatt fetttsyreoksidasjon i skjelettmuskel [41, 42]. I en normalsituasjon dominerer fetttsyreoksidasjon under fastende betingelser mens glukoseoksidasjon øker med insulinsstimulering etter et måltid og dominerer postprandialt [39, 42, 43] (figur 1.5a og c). Metabolsk infleksibilitet ble definert av Kelly et al [44] som lav fastende fetttsyreoksidasjon og nedsatt evne til å skifte fra fett til glukoseoksidasjon som respons på insulin (figur 1.5b og d). Overvekt og T2D er forbundet med metabolsk infleksibilitet, men årsaken bak utvikling av infleksibiliteten er fortsatt uklar [42]. Flere studier har observert at den metabolske fleksibiliteten til skjelettmuskelceller avhenger av insulinsensitivitet, prosent kroppsfett og fysisk form [39, 45]. Det er foreslått at økt tilgang til energisubstrater kan være del av forklaringen på utvikling av metabolsk infleksibilitet [42]. Det er også blitt observert redusert evne til å skifte mellom energisubstrater hos menn med nedsatt glukosetoleranse, dette kan tyde på at metabolsk infleksibilitet er tilstede tidlig i utviklingen av T2D og muligens har en innvirkning på utviklingen av sykdommen [46]. Hessvik et al. [43] hevder at god adapterbarhet indikerer god evne til å tilpasse seg diett med høyt fettinnhold, og kan dermed virke beskyttende mot utvikling av fedme. Det er i midlertidig fortsatt uklart om metabolsk fleksibilitet er en medvirkende årsak til, eller konsekvens av fedme.

*In vivo* benyttes ofte respiratorisk kvotient (RQ) for å bestemme metabolsk fleksibilitet, RQ beregnes som ratio av produsert CO<sub>2</sub> per forbrukt O<sub>2</sub>. RQ gjenspeiler hvilke energisubstrater

som forbrukes. Høy RQ ( $RQ \approx 1$ ) gjenspeiler karbohydratoksidasjon mens lavere RQ tyder på økende innslag av fettsyreoksidasjon. Høy fastende RQ er vist å ha sammenheng med vektoppgang [47]. *In vitro* kan metabolsk fleksibilitet beskrives ved hjelp av tre parametere; adapterbarhet, suppressibilitet [39] og substratregulert fleksibilitet [43]. Adapterbarhet er definert som skjelettmuskelcellens kapasitet til å øke akutt fettsyreoksidasjon i samsvar med økt tilgjengelig fettsyrekonsentrasjon. Suppressibilitet er definert som skjelettmuskelcellens evne til å undertrykke fettsyreoksidasjon når glukose er tilstede [39]. Substratregulert fleksibilitet er definert som skjelettmuskelcellens evne til å skifte mellom energisubstrat etter hva som er tilgjengelig, fra høy fettsyrekonsentrasjon (som under faste) til lav fettsyrekonsentrasjon og høy glukosekonsentrasjon (som etter et måltid) [43]. Det er vist at *in vitro* parametrene gjenspeiler *in vivo* situasjonen til en viss grad [39].



**Figur 1.5 Metabolsk fleksibilitet** Under fastende betingelser vil skjelettmuskel hos en metabolsk fleksibel person (A) ha en robust preferanse for fettsyreoksidasjon, mens glukoseoksidasjonen samtidig undertrykkes. Skjelettmuskel hos en metabolsk infleksibel person (B) vil ikke ha den samme preferansen for fettsyreoksidasjon og glukoseoksidasjonen vil ikke bli undertrykket på samme måte. Etter et måltid, postprandialt vil skjelettmuskel hos en metabolsk fleksibel person (C) foretrekke glukoseoksidasjon, mens fettsyreoksidasjonen undertrykkes. I skjelettmuskel hos den metabolsk infleksible personen (D) vil man ikke ha det samme skiftet i energisubstrat. Modifisert fra [45]

## 1.6 Skjelettmuskelceller *in vitro*

Når man gjennomfører *in vivo*-studier er bildet komplekst og det kan det være vanskelig å skille mellom direkte og indirekte effekter. Å finne årsakssammenhenger kan være vanskelig etter som man ved eksponering vil påvirke flere mekanismer og systemer enn de man ønsker å undersøke. Ved å dyrke skjelettmuskelceller *in vitro* har man kontroll over de enkelte faktorer, alle parametere kan holdes stabile over tid og man kan dermed lettere gjennomføre mekanismestudier og observere enkelteffekter isolert. Problemet med denne modellen er at man ikke nødvendigvis kan generalisere resultatene til å gjelde *in vivo*, ettersom man utelukker en del sammenhenger som faktisk forekommer *in vivo*. Det er imidlertid gjort flere studier hvor resultater fra *in vitro*-forsøk er korrelerer mot kliniske *in vivo*-parametere. Det er her funnet sterke korrelasjoner som tyder på en viss sammenheng mellom *in vitro*-*in vivo*-situasjoner [39, 48].

## 1.7 Substanser brukt til behandling av myotubene

### 1.7.1 Oljesyre

Oljesyre (OA) er enumettet fettsyre (MUFA) og utgjør ca 30% av totalt mengde ikke-essensielle fettsyre som er tilstedet i blodet [49]. OA gir ikke de negative effektene, i form av økt risiko for kardiovaskulær sykdom og økt insulinresistens, som mettede fettsyrer utviser [50]. OA utviser heller ikke de positive effektene, i form av økt fettsyreopptak og -oksidasjon og glukoseopptak og -oksidasjon i skjelettmuskelceller, som flerumettede fettsyrer er assosiert med [51]. OA foreligger på *cis*-form og studier har vist at *cis*-MUFAs er relativt nøytrale med hensyn til effekter på LDL og HDL i forhold til *trans*-MUFAs [52]. OA blir dermed benyttet som en nøytral fettsyre.

### 1.7.2 Eikosapentaensyre

Eikosapentaensyre (EPA) er en flerumettet fettsyre (PUFA). I likhet med andre  $\omega$ -3 fettsyrer utviser EPA effekter i form av redusert risiko for utvikling av koronarsykdom [53]. I *in vitro* studier har EPA vist seg å øke opptak av OA [43], å øke akkumulering av TAG og PL, å redusere oksidasjon av fettsyre, å øke opptak av glukose uten å redusere insulinfølsomheten

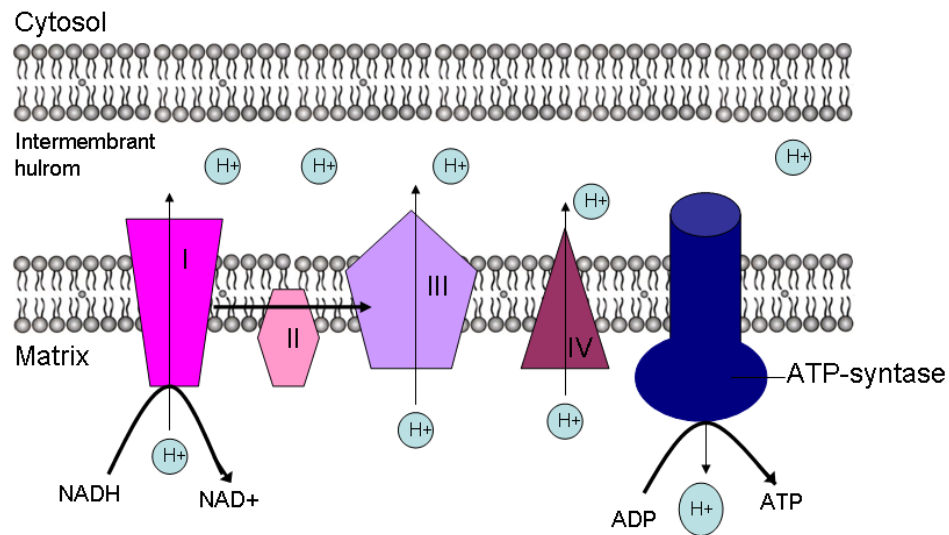
[51]. Det er vist at EPA påvirker metabolsk fleksibilitet *in vitro* ved å øke adapterbarhet, suppressibilitet og substratregulert fleksibilitet [43]. Mekanismene bak EPA og andre  $\omega$ -3 fettsyrers effekter på fettsyre- og glukosemetabolisme er enda ikke kartlagt, men trolig står regulering av acyl-CoA, DAG, TAG, lipidlagring, lipidoksidasjon og insulinstimulering sentralt [51].

### 1.7.3 Glukose

Kronisk høy glukose er i seg selv kjent for å bidra til insulinresistens i skjelettmuskelceller. [54]. Kronisk høy glukose endrer fettsyremetabolismen i humane skjelettmuskelceller i favør av akkumulering av intracellulære lipider. Høy glukose øker lipogenesen og øker nivåene av cellulære lipider [55]. *In vitro* har høy glukose vist å redusere både glukose- og OA-oksidasjon og i tillegg redusere suppressibiliteten av akutt glukosetilsetning på OA-oksidasjonen. [56]

### 1.7.4 Karbonylcyanid p-trifluormetoksyfenylhydrazon

I elektrontransportkjeden (ETC) overføres elektroner fra elektrondonorer til elektronakseptorer ved hjelp av redoks-reaksjoner. Disse reaksjonene frigjør energi som benyttes for å danne adenosin trifosfat (ATP), energibærende forbindelser. En forutsetning for at ETC skal fungere er at protongradienten, som bygger seg opp mens elektroner passerer gjennom kjeden, opprettholdes. Denne protongradienten er drivkraften bak ATP-syntase, enzymet som omgjør ADP til ATP. [57] (figur 1.6). Karbonylcyanid p-trifluormetoksyfenylhydrazon (FCCP) virker ved å ødelegge protongradienten i elektrontransportkjeden slik at ATP-syntase ikke får omdannet ADP til ATP. FCCP kalles derfor en avkobler av cellenes oksidative fosforylering (OXPHOS). Energien som blir dannet via redoks-reaksjonene går til produksjon av varme og H<sub>2</sub>O i stedet for til ATP-produksjon [58]. Ved å eksponere skjelettmuskelceller for FCCP vil man få et bilde av den maksimale OXPHOS-kapasiteten, og ved å sammenligne fettsyre- eller glukoseoksidasjon med og uten FCCP tilstede vil man få en indikasjon på hvor stor OXPHOS-reservekapasiteten til skjelettmuskelcellene er.



**Figur 1.7 Elektrontransportkjeden**  $NAD^+$ ; nicotinamid adenin dinukleotid,  $NADH$ ; redusert form av  $NAD^+$ ,  $ADP$ ; adenosin difosfat,  $ATP$ ; adenosin trifosfat,  $H^+$ ; hydrogen-ion. Modifisert fra [57]

## 1.8 Formål med oppgaven

En undersøkelse utført ved senter for sykkelig overvekt ved sykehuset i Tønsberg viste at kun ca 30 % av ekstremt overvektige som var kvalifisert for bariatrisk kirurgi hadde etablert type 2-diabetes [J. Hjelmesæth personlig meddelelse]. Ettersom det gjennom studier de siste tiårene er vist tydelig sammenheng mellom fedme og utvikling av T2D, og ca 80 % med T2D lider av overvekt eller fedme, ble dette spørsmålet stilt: Hvorfor er noen pasienter med ekstrem overvekt beskyttet mot utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes? For å komme nærmere et svar på dette spørsmålet ble delmål for denne oppgaven satt.

- Studere og sammenligne fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak hos humane myotuber fra normalvektige, ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse eller ekstremt overvektige med T2D.
- Studere og sammenligne glukoseoksidasjon og glukoseopptak hos humane myotuber fra normalvektige, ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse eller ekstremt overvektige med T2D.
- Beregne og sammenligne *in vitro* parametre for metabolsk fleksibilitet hos de tre donorgruppene og ved ulike forbehandlinger.
- Studere uttrykk av gener tilknyttet fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon i humane myotuber fra de tre donorgruppene.
- Studere insulineffekter ved å undersøke fosforylert Akt/PKB i humane myotuber fra de tre donorgruppene.



## 2. Materialer og metode

### 2.1 Materialer

Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS m/Ca<sup>2+</sup> og Mg<sup>2+</sup>) og Ham's F-10 Glutamax nutrient mixture ble kjøpt fra Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). L- karnitin hydroklorid, bovint serum albumin (BSA) HEPES, D-glukose, oljesyre og dimetylsulfoksid (DMSO) ble kjøpt fra Sigma-Aldrich Insulin Actrapid® Penfill ble kjøpt fra NovoNordisk (Bangsværd, Danmark). Eikosapentaensyre er fra Laborel AS (Oslo, Norge). [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (55 mCi/mmol), D-[<sup>14</sup>C (U)]glukose (5 mCi/mmol) kom fra American Radiolabeled Chemicals Inc. (St Louis, MO, USA). OptiPhase Supermix, Unifilter®-96 GF/B og TopSeal®-A gjennomsiktig film ble skaffet fra PerkinElmer (Shelton, Scotland, USA). 96-brønners Isoplate® ble kjøpt fra Wallac OY (Turku, Finland). D-[<sup>14</sup>C(U)]deoksyglukose (286,6 mCi/mmol) ble levert fra PerkinElmer Life and Analytical Science, Boston, MA, USA. β-merkaptotetanol ble kjøpt fra Sigma-Aldrich. Fettfri tørrmelk var en gave fra Normilk AS, Levanger, Norge. Enhanced chemiluminescence reagents (ECL) ble kjøpt fra GE Healthcare, Buckinghamshire, UK. Phospho-Akt (Ser473) og Akt Antibody (#9272) ble kjøpt fra Cell Signaling Technology Inc. Beverly, MA, USA. Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate, goat anti-rabbit IgG-horse raddish peroxidase conjugate, 30 % Acrylamid/Bis løsning, "Tetramethylethylenediamine" (TMED), Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards, 10xTGS-buffer og 10xTG-buffer ble levert fra BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA. BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit fra Pierce ble kjøpt fra Boule Nordic AS, Ski, Norge. Kodak X-Ray fixer og Kodak X-Ray fremkaller ble kjøpt fra Carestream Health, Inc, Rochester, NY, USA. Dietylpyrokarbonat (DEPC) ble skaffet fra Sigma-Adrich. Agilent Total RNA isoleringskit var skaffet fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). SYBR green, Taqman reverse transkripsjonskitreagenser og MicroAmp® Optical Reaction Plate var skaffet fra Applied Biosystem (Warrington, UK). Primere (GAPDH, 36B4, CD36 og CPT-1B) var kjøpt fra Invitrogen (Carlsbad, CA). Dulbecco's Modified Eagle medium med Glutamax (DMEM/GLutamax-I), Fungizone® (250 µg/ml amphotericin), føtalt kalveserum (FCS), føtalt storfeserum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin (10000 IE/10 mg/ml) ble kjøpt fra Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). Ultrosor G ble kjøpt fra BioSerpa, Process division of CIPHERGEN Biosystems Inc (Paris, Frankrike). Hanks Balance Salt Solution (HBSS) var fra PAA Laboratories GmbH (Pasching, Østerrike). 96-brønners brett Corning®CELLbind Surface var kjøpt fra Corning Inc. (Corning, NY, USA) SkBM-kit (SkGM) produsert av Lorenza Clotetics ble levert av Medinor. 10 x TGS Buffer og 10 x TG Buffer ble kjøpt fra Bio-Rad. 96-brønners microtiter microplate fra nunc var produsert av Thermo Scientific i Danmark. Karbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA. Quant-iT<sup>TM</sup> RNA BR Assay Kit ble kjøpt fra Invitrogen (USA), High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ble kjøpt fra Applied Biosystems. Nitrocellulosemembran (Hydrobond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup>) ble kjøpt fra GE healthcare.

## 2.2 Donorkarakteristika

Det ble benyttet humane myotuber isolert fra skjelettmuskelbiopsier. Myotuber fra normalvektige(NV)-kontrolldonorer stammet fra muskelbiopsier fra bukveggen hentet fra nyredonorer ved Rikshospitalet. Myotuber fra ekstremt overvektige(EO)-donorer stammet fra muskelbiopsier fra bukveggen hentet ut under bariatrisk kirurgi ved senter for sykkelig overvekt ved sykehuset i Tønsberg. Alle donorene gav skriftlig samtykke til deltakelse i prosjektet og prosjektet er blitt godkjent av regional etisk komité.

Donorene fra 3 ulike grupper ble benyttet i forsøkene;

- Normalvektige kontroller (NV-kontroller) (tabell 2.1)
- Ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) (tabell 2.2)
- Ekstremt overvektige med type 2-diabetes mellitus (EO-T2D) (tabell 2.3)

**Tabell 2.1 Donorkarakteristika; Normalvektige kontroller (NV-kontroll)**

Donorkode	Alder	Kjønn	KMI	Fastende glukose (mmol/L)	Fastende triacylglycerol (mmol/L)
LD 8	43	K	21,8	4,7	0,9
LD 15	55	K	29,1	6,9	1,1
LD 17	56	K	23,2	5,6	0,6
LD 19	65	K	23,7	6,4	1,1
LD 20	46	K	21,7	5,1	0,6
LD 22	40	M	28,7	5,0	1,5
LD 27	44	K	21,7	5,2	0,4
LD 30	36	M	26,2	3,7	0,9
LD 31	50	K	20,2	2,5	0,6
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>48± 2</b>		<b>24,0± 0,7</b>	<b>5,0± 0,3</b>	<b>0,9± 0,1</b>

Klassifiseringen av de ekstremt overvektige donorene ble bestemt ved å måle fastende blodglukose (mmol/L) og å kartlegge eventuell antidiabetisk behandling (tidligere diagnostisert type 2-diabetes). I forhold til de ekstremt overvektige donorene med angivelig normal glukosetoleranse, kan jeg ikke være sikker på at de faktisk har normal glukosetoleranse. For å konstatere klassifiseringen burde det vært gjennomført en glukosebelastningstest. I denne oppgaven brukes betegnelsen ekstremt overvektige

med normal glukosetoleranse (EO-NGT) om de donorene som ikke har fått påvist type 2-diabetes.

**Tabell 2.2 Donorkarakteristiska; Ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT)**

Donorkode	Alder	Kjønn	KMI	Fastende glukose (mmol/L)	HbA1c (%)	Fastende triacylglycerol (mmol/L)
EO 4	47	K	40,5	5,2	5,9	1,5
EO 6	41	K	48,0	4,9	5,1	1,7
EO 7	39	K	55,1	4,2	5,9	2,0
EO 9	45	M	48,8	7,2	6,3	3,0
EO 15	38	M	49,7	5,1	5,7	1,9
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>42± 1,5</b>		<b>48,4± 2,1<sup>a</sup></b>	<b>5,3± 0,4</b>	<b>5,8± 0,2</b>	<b>2,0± 0,2<sup>a</sup></b>

a:  $P \leq 0,05$  mot NV-kontroll (tabell 2.1)

**Tabell 2.3 Donorkarakteristiska; Ekstremt overvektige med type 2 diabetes (EO-T2D)**

Donorkode	Alder	Kjønn	KMI	Fastende glukose (mmol/L)	HbA1c (%)	Fastende triacylglycerol (mmol/L)
EO 3	63	M	46,3	11,0	8,5	2,5
EO 5	41	K	51,3	10,1	11,7	1,3
EO 11	60	K	46,7	5,8	6,3	1,9
EO 13	47	K	46,0	7,4	7,1	2,2
EO 14	43	K	40,0	6,9	8,5	1,6
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>51± 4,0</b>		<b>46,1± 1,6<sup>a</sup></b>	<b>8,2± 0,9<sup>ab</sup></b>	<b>8,4± 0,8</b>	<b>1,9± 0,2<sup>a</sup></b>

a:  $P \leq 0,05$  mot NV-kontroll (tabell 2.1), b:  $P \leq 0,05$  mot EO-NGT (tabell 2.2)

## 2.3 Opprettelse av cellebank

Opprettelse av cellebank (biobank) er essensielt for enhver forskning som involverer celler. I utgangspunktet får en relativt få celler isolert fra muskelbiopsier fra hver donor. Det er ofte nødvendig å utføre flere forsøk på hver donor for å kunne trekke sikre konklusjoner, da er man avhengig av oppskalering av cellene fra muskelbiopsiene. Følgende prosedyre ble benyttet ved isolering og oppskalering av satelittceller fra muskelbiopsier hentet fra de ekstremt overvektige donorene.

### 2.3.1 Isolering av muskelceller

Muskelbiopsiene ble mottatt fra Rikshospitalet eller fra Senter for Sykelig Overvekt ved sykehuset i Tønsberg og transportert i Hams F-10 medium. Ved ankomst ble biopsiene lagt i

20 ml nytt Hams F-10 medium. Biopsiene ble deretter overført til en petriskål sammen med Hams F-10 medium hvor eventuelt fett ble fjernet. Biopsiene ble kuttet opp i små biter, vev og medium ble overført til et sentrifugerør. 20 ml trypsin/EDTA (37°C) ble tilsatt for å løsne muskelcellene fra annet vev og blandingen ble ristet i romtemperatur i 20-30 minutter. Etter risting stod blandingen til sedimentering i 1-2 minutter før supernatanten ble sugd av, satt på is og tilsatt 10 % FBS for å inaktivere trypsin/EDTA. Nye 20 ml trypsin/EDTA ble tilsatt vevet, risting og overføring av supernatant ble gjentatt to ganger. De til sammen 60 ml med supernatant ble samlet og tilsatt FBS til en sluttkonsentrasjon på 10 %. Løsningen ble sentrifugert i 7 minutter ved 1800 rpm, deretter ble supernatanten sugd av og cellepelleten ble resuspendert i en passende mengde SkGM-dyrkningsmedie (appendiks 1.4).

Isoleringsmetoden er basert på en studie som har vist at denne metoden førte til svært høy renhet på myotube-kulturene [59]. Cellesuspensjonen ble overført til BioCoat Falcon 25 cm<sup>2</sup> flasker og dyrket ved 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Medium ble skiftet 48 timer etter utsåing, når cellene hadde festet seg. Deretter ble medium skiftet 2 ganger per uke. Når cellene var 90 % konfluente i 25 cm<sup>2</sup> flasken ble cellene splittet til flere 75 cm<sup>2</sup> flasker. Når disse flaskene ble 90 % konfluente ble de frosset ned og lagret i nitrogentank (-196°C) for videre oppskalering på et senere tidspunkt.

### 2.3.2 Nedfrysning av celler

Medium ble sugd av og cellene ble vasket med HBSS 3 ganger (2 ml for 25 cm<sup>2</sup> flaske og 4 ml for 75 cm<sup>2</sup> flaske) dette for å vaske vekk rester av serum som ville inaktivert trypsin/EDTA. Deretter ble cellene løsnet fra flasken ved hjelp av trypsin/EDTA (2 ml for 25 cm<sup>2</sup> flaske og 5 ml for 75 cm<sup>2</sup> flaske). Flasken ble inkubert ved 37°C i 5 minutter til cellene var løsnet. Innholdet i flasken ble overført til et sentrifugerør sammen med SkGM-dyrkningsmedie. Blandingens ble sentrifugert i 7 minutter ved 1800 rpm. Supernatanten ble sugd av og cellepelleten resuspendert i 1 ml SkGM-dyrkningsmedie. Cellene ble talt ved hjelp av elektronisk celleteller; Countess<sup>TM</sup> automated cell counter fra Invitrogen og passende mengde frysemedium (appendiks 1.5) ble blandet. Celletetthet var ca 6,0 x 10<sup>5</sup> celler per ampulle. Cellen ble umiddelbart frosset ved -20°C i 30 minutter, deretter -70°C over natten. Etter ca 24 timer ble ampullene overført til nitrogentank (-196°C)

### 2.3.3 Oppskalering

Cellene ble løsnet på samme måte som til nedfrysning. Etter sentrifugering ble cellepelletten resuspendert i 1 ml SkGM-dyrkningsmedie og talt ved hjelp av elektronisk celledetektor.

Cellesuspensjonen ble deretter tilsatt passende mengde SkGM-dyrkningsmedie (10 ml per flaske) og fordelt i 75 cm<sup>2</sup> flasker med celletetthet ca.  $4,5 \times 10^5$  celler per flaske. SkGM-dyrkningsmedie ble byttet 2 ganger per uke. Når cellene var 90 % konfluente i 75 cm<sup>2</sup> flasken ble cellene enten splittet til flere flasker eller frosset ned.

## 2.4 Celledyrking

### 2.4.1 Utsåing av satellittceller

Cellene ble hentet fra nitrogentank og tint raskt over vannbad. 1 ml utsåingsmedium (appendiks 1.1) ble tilsatt fryseampullen for å fortynne celletoksisk DMSO, som er tilstede i frysemedium for å forhindre cellelysis under frysing. Innholdet i fryseampullen ble overført til sentrifugerør og ytterligere 3 ml utsåingsmedium ble tilsatt. Cellesuspensjonen ble sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Supernatanten ble sugd av og cellepelletten ble resuspendert i 2 ml utsåingsmedium. Celledetektor per ml ble bestemt ved hjelp av elektronisk celledetektor. Ca  $6,0 \times 10^5$  celler ble tatt ut for utsåing på 96-brønners brett (ca 6000 per brønn). Ca  $1,5 \times 10^5$  celler ble tatt ut for utsåing i 25 cm<sup>2</sup> flasker. Uttak fra celsuspensjon ble tilsatt utsåingsmedium til 10 ml og sådd ut på 96-brønners ferdigcoatede CellBind 3300 brett, 100 µl per brønn. Til flasker ble celsuspensjon tilsatt utsåingsmedium til 3 ml og sådd ut på Biocoat falcon 25 cm<sup>2</sup> flasker. Utsåingsmedium ble byttet ut med proliferasjonsmedium (appendiks 1.2), etter 24 timer. Proliferasjonsmedium ble skiftet hver 2.-3. dag til cellene var 80 % konfluente.

### 2.4.2 Differensiering til myotuber

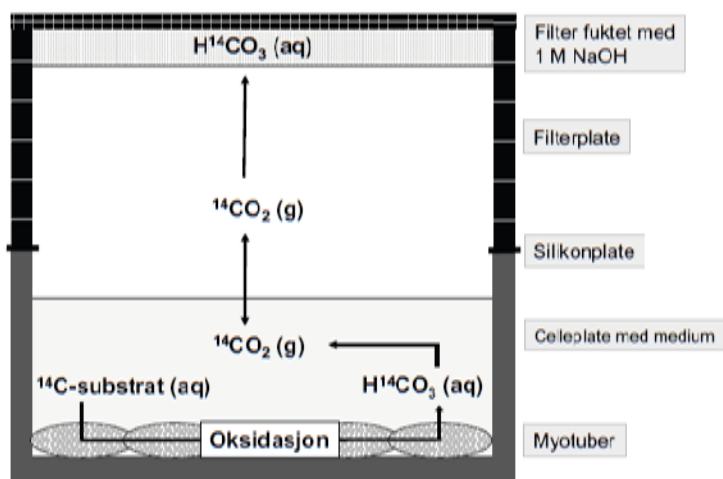
Ved 80 % konfluens ble proliferasjonsmedium byttet ut med differensieringsmedium (appendiks 1.3). Satellittcellene startet da en differensieringsprosess mot flerkjernede myotuber (muskelfibre). Differensieringsmediet ble skiftet hver 2.-3. dag. Forsøk ble utført på 6-8 differensieringsdag [60]. Ulike forbehandlinger ble tilsatt cellene sammen med

differensieringsmediet siste 4 døgn [61] (høy glukose; 20 mM glukose) og siste 24 timer (0,1 mM OA og EPA) av differensieringsperioden. Differensieringsmedium uten tilsetning ble benyttet som kontroll. For 96-brønners-brett ble det benyttet 4 brønner per behandling (4 paralleller) i hvert substratoksidasjonsforsøk.

## 2.5 "Multiwell Fuel Handling"

Metode for substratoksidasjon utviklet av Wensaas et al. [62] ble benyttet (Figur 2.1).

Metoden baseres på at humane myotuber tar opp og oksiderer radioaktivt merket substrat til  $[C^{14}]CO_2(g)$ . Radioaktiv OA spaltes til acetyl-CoA via  $\beta$ -oksidasjon og entrer deretter Krebszyklus hvor det spaltes av til  $[C^{14}]CO_2(g)$ . Radioaktiv glukose spaltes via glykolysen til acetyl-CoA, som på samme måte som acetyl-CoA fra fettsyren entrer Krebszyklus og spaltes av til  $[C^{14}]CO_2(g)$ . Oksidasjonen kvantifiseres ved å måle mengden  $[C^{14}]CO_2(g)$  produsert. Metoden ble benyttet for å undersøke forskjeller blant de tre gruppene med hensyn på opptak og oksidasjon av fettsyre og glukose. Begrepene celleassosierte fettsyrer og celleassosiert glukose benyttes for å omtale den andelen radioaktivsubstans som blir tatt opp, men ikke oksidert. Begrepet fraksjonell oksidasjon benyttes om andelen oksidert fettsyre i forhold til fettsyre tatt opp i cellene.



**Figur 2.1 Prinsipp for substratoksidasjonsmetoden**  $[1-^{14}C]$ Acetyl-CoA fra enten fettsyre eller glukose oksideres til  $CO_2$  i myotubene.  $CO_2$  fanges opp av filter fuktet med NaOH, bindes som  $H^{14}CO_3$ . Oksidasjon kan kvantifiseres ved å måle mengden  $[C^{14}]$  i filteret [62].

### 2.5.1 Substratoksidasjonsforsøk med radioaktiv oljesyre, glukose og D-deoksyglukose

Forsøk ble utført på 7. differensieringsdag. Differensieringsmedium ble erstattet av akuttmedium (appendiks 2.1-2.9) 50µl per brønn. Følgende radioaktive substanser ble benyttet:

- $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$  (1 µCi/ml eller 0,29 µCi/ml)
- $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]\text{glukose}$  (1 µCi/ml)
- $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]\text{deoksyglukose (DOG)}$  (1 µCi/ml)

Total fettsyrekonsentrasjon i akuttmediene med  $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$  var 100 µM eller 5 µM.

Forsøkene ble utført i nærvær av 5 mM glukose eller i fravær av glukose for begge fettsyrekonsentrasjonene. Konsentrasjon i akuttmediene med  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]\text{glukose}$  eller  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]\text{DOG}$  var henholdsvis 111 µM og 100 µM. Under  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]\text{DOG}$ -forsøkene var det i tillegg tilsatt 100 µM glukose. Forsøkene ble utført  $\pm$  100 nM insulin for  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]\text{glukose}$  og  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]\text{DOG}$ .

En 96-brønners filterplate (Unifilter®- 96 GF/B®) ble fuktet med 20µl 1 M NaOH per brønn. Filterplaten ble montert sammen med celleplaten med en silikonplate mellom slik at det ble et lufttett system. Det ble benyttet en metallplate på toppen av filterplaten for å sørge for jevnt trykk. Platene ble holdt sammen av en  $\text{CO}_2$ -trapper og inkubert ved 37°C i 4 timer.  $[\text{C}^{14}]\text{CO}_2(\text{g})$  ble kontinuerlig fanget opp under inkubering ved at  $[\text{C}^{14}]\text{CO}_2(\text{g})$  reagerte med NaOH i filterplaten til  $\text{H}^{14}\text{CO}_3(\text{aq})$ . Etter 4 timer ble filterplaten og celleplaten separert. Filterplaten ble tilsatt 40µl Optiphas Supermix® per brønn og forseglet med Topseal®-A. Etter 48 timer ble mengden produsert  $[\text{C}^{14}]\text{CO}_2(\text{g})$  målt ("counts per minute"), ved hjelp av MicroBeta® PLUS. Dette for å kvantifisere mengden fettsyrer eller glukose som hadde blitt metabolisert.

Mengden fettsyre eller glukose som tas opp i myotubene kunne delvis beskrives ved å måle mengden celleassosierte  $[\text{C}^{14}]\text{fettsyrer}$ . Ettersom en andel av de absorberte substratene ble metabolisert i mitokondriene til  $\text{CO}_2$  ga ikke måling av cellassosierte  $[\text{C}^{14}]\text{fettsyrer}$  eller  $[\text{C}^{14}]\text{glukose}$  et komplett opptaksbilde. Disse målingene kunne i midlertidig benyttes sammen med målingen av fettsyreoksidasjonen (måling av  $[\text{C}^{14}]\text{CO}_2$ ), for å skape et noe mer nøyaktig bilde av opptaket av  $[\text{C}^{14}]\text{fettsyrer}$  og  $[\text{C}^{14}]\text{glukose}$  i myotubene. For et komplett bilde av fettsyreopptaket måtte man i tillegg målt de syreløselige metabolittene (ASM). I

denne oppgaven ble det ikke gjennomført noen ASM-målinger, fettsyreopptaket ble derfor definert som summen av celleassosiert og CO<sub>2</sub>. D-[<sup>14</sup>C(U)]DOG er i tidligere forsøk vist å bli tatt opp via de samme mekanismene som glukose uten at isotopen metaboliseres. D-[<sup>14</sup>C(U)]DOG kunne dermed benyttes for å oppnå et relativt komplett bilde av glukoseopptaket i myotubene. I tillegg ble glukoseopptak definert som summen av celleassosiert og CO<sub>2</sub> for forsøkene med D-[<sup>14</sup>C (U)]glukose.

Etter 4 timers inkubering ble celleplaten vasket to ganger med 150µl PBS-buffer (pH ca 7,3) og lysert ved hjelp av 200µl 0,1M NaOH per brønn. Celleplaten ble deretter frosset ned (-20°C). For å måle celleassosierte [<sup>14</sup>C]fettsyrer og [<sup>14</sup>C]glukose ble celleplaten tint og 50µl homogenisert celleduspensjon fra hver brønn i celleplaten ble overført til et 96-brønners Isoplate®. 100µl Optiphas Supermix ble tilsatt per brønn og platen ble forseglet med Topseal®-A. Etter 2 timer ble radioaktiviteten målt ("counts per minute") ved hjelp av MicroBeta® PLUS.

### 2.5.2 Proteinmåling

Metode utviklet av Bradford [63] ble benyttet. Metoden er basert på en spektrofotometrisk prosedyre for å måle proteinkonsentrasjonen i en løsning. 50µl homogenisert celleduspensjon fra hver prøve ble overført til en 96-brønners-mikrotitrerplate. Det ble laget en standardkurve av BSA i ulike konsentrasjoner (0, 10, 20, 40 og 80 µg/ml) løst i 0,1M NaOH. Alle brønnene ble tilsatt 200µl "Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate" (fortynnet 1:5 med destillert vann). Etter tilsetning av fargereagens stod prøvene i romtemperatur i 5 minutter før absorbansen ved bølglengde 595nm ble målt ved hjelp av Wallac Victor<sup>TM</sup> microplateleser. Konsentrasjonen av protein i prøvene ble bestemt ved hjelp av standardkurven som var basert på de kjente proteinkonsentrasjonene i standardprøvene.

## 2.6 Revers transkriptase-Real-time-polymerase kjedereaksjon

Revers transkriptase-Real-time-polymerase kjedereaksjon (RT-Real-time-PCR) er en metode som kan benyttes for nøyaktig å se på endringer i mRNA-uttrykk i cellen. mRNA fra cellen gjøres om til dobbel-trådet komplementært DNA (cDNA) for deretter å oppskalere den



gensekvensen som er ønskelig å undersøke ved hjelp av spesifikke primere. Man får dermed et detekterbart nivå av den spesifikke gensekvensen som er av interesse. Det ble benyttet RT-Real-time-PCR for å undersøke forskjeller i de tre gruppene i forhold til uttrykk av gener med tilknytning til fettsyreopptak (Cluster of differentiation 36; CD36) og fettsyreoksidasjon (Carnitine palmitoyltransferase 1; CPT-1). Effekt av tilsetning av EPA i dyrkningsmediumet til cellen på uttrykket av de to genene nevnt ovenfor ble også undersøkt.

### 2.6.1 Høsting av celler og isolering av mRNA

Satellittceller ble proliferert og differensiert til myotuber i Biocoat falcon 25cm<sup>2</sup> flasker. Myotubene ble høstet på 7. differensieringsdag. Siste døgn av differensieringsperioden ble noen av cellene forbehandlet med 100µM EPA i differensieringsmedium. På høstingsdagen ble dyrkningsmedium fjernet og cellene ble vasket med PBS-buffer i DEPC-dH<sub>2</sub>O 2x 2ml per flaske. Rester ble sugd av før 300µl Agilent Technologies Lysis Solution ble tilsatt. Flaskene ble skrapet godt før lysatet ble overført til autoklaverte eppendorfrør. Standardisert RNA isolating Kit fra Agilent Technologies ble benyttet for isolering av mRNA. Alt arbeid med RNA ble utført med hansker og sterilt utstyr for å unngå RNase kontaminasjon. Cellelysatet ble overført til en miniprefiltreringskolonne og sentrifugert i 3 minutter ved 16000g, de større cellefraksjonene ble nå sittende fast i kolonnen. Filtratet ble tilsatt et tilsvarende volum av 70 % etanol og inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. Filtrat/etanol-blandingen ble overført til en mini-isoleringskolonne og sentrifugert i 30 sekunder ved 16000g. RNA var nå bundet til kolonnen og filtratet ble kastet, kolonnen ble vasket 2 ganger med vaskeløsning (sentrifugert 30 sekunder ved 16000g). RNA ble eluert ut ved å tilsette 20µl nukleasefritt vann til kolonnen og sentrifugerte i 1 minutt ved 16000g. For å kvantifisere mengden rensert mRNA i prøvene ble det tatt ut 2 µl prøve som ble tilsatt 198µl reaksjonsløsning fra standardisert Quant-iT<sup>TM</sup> RNA BR Assay Kit for analyse i Qubit<sup>TM</sup> fluorometer, et spektrofotometer som utfører "Optical density" (OD)-målinger.

### 2.6.2 cDNA-syntese

Standardisert High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit fra Applied Biosystems ble benyttet i cDNA-syntesen. Et volum tilsvarende ≤ 1µg RNA ble tatt ut av prøvene og overført til et mini-eppendorfrør (MicroAmp®). Nukleasefritt vann ble tilsatt prøven til 13,2µl. 6,8µl reaksjonsløsning ble tilsatt hver prøve og blandingen ble plassert i Thermal

Cycler 9600 Perkin-Elmer, for cDNA syntese. Betingelsene under syntesen var som følger: prøvene ble eksponert for 25°C i 10 minutter, heksamer i template priming, deretter ble prøvene utsatt for 37°C i 80 minutter, reverse transkriptase pågikk, og tilslutt ble prøvene utsatt for 85 °C i 5 minutter, reverse transkriptase ble da inaktivert.

### 2.6.3 RT-Real time-PCR

0,8µl ble tatt ut fra hver prøve for å lage cDNA-miks. Blandingen ble fortynnet 1:5 i DEPC-H<sub>2</sub>O og deretter videre 1:5 til 4 ulike konsentrasjoner. Denne fortynningsrekken dannet grunnlaget for standardkurven. Mengden amplifisert cDNA i de ulike prøvene ble beregnet ut fra denne standardkurven. Deretter ble prøvene fortynnet 1:5 i DEPC-H<sub>2</sub>O. 2,5µl av fortynnede prøver, standardene og vann (negativ kontroll) ble overført til en MicroAmp® Optical Reaction Plate. Reaksjonsblandingen (appendiks 3.1) ble laget i stand med de ulike primerene til hvert gen (tabell 2.4) og tilsatt brønnene 22,5µl til hver. Brettet ble satt inn i instrumentet ABI PRISM 7000 Applied Biosystem og det ble kjørt 40 sykluser. Hver syklus bestod av to deler; prøvene ble utsatt for 95°C i 15 sekunder (denatureringsfasen- DNA-tråden ble separert slik at de komplementære primerene kunne komme til) og deretter 60°C i 60 sekunder (hybridiseringsfasen- primerene bandt seg til DNA-tråden). Etter denne fasen ble DNAet amplifisert i en polymeriseringsfase. 2 x SYBR Green PCR Master mix var en fluorescerende blanding som kun bandt seg til dobbeltrådet DNA. Intensiteten på fluorescensen fra 2 x SYBR Green PCR Master mix var proporsjonal med mengde cDNA i prøven. Resultatene ble normalisert i mot de endogene-kontrollene 36B4 og GAPDH.

**Tabell 2.4 Primere benyttet i oppgaven**

Gener	Genbanknummer	Primer
GAPDH	NM_002046	F: 5`-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3` R: 5`-GGC ATG GAC TGT GGT
36B4	NM_007475	F: 5`-ATC TCC AGA GGC ACC ATT GAA-3` R: 5`-TCG CTG GCT CCC ACC TT-3`
CPT 1B	L39211	F: 5`-GAG GCC TCA ATG ACC AGA ATG T-3` R: 5`-GTG GAC TCG CTG GTA CAG GAA-3`
CD36	L06850	F: 5`-AGT CAC TGC GAC ATG ATT AAT GGT-3` R: 5`-CTG CAA TAC CTG GCT TTT CTC AA-3`

## 2.7 Immunoblotting (Westernblotting)

Immunoblotting eller westernblotting er en molekylærbiologisk metode for å detektere og kvantifisere spesifikke proteiner. SDS og koking av prøvene denaturerer proteinene og sørger for negativ ladning på hele molekylet.  $\beta$ -merkapttoetanol sørger for at alle disulfidbindinger som holder proteinet på plass i sin tredimensjonale konformitet ble brutt og forhindret nydannelse av slike. Gelelektroferese i en polyakrylamidgel benyttes for å separere de denaturerte og negativt ladede proteinene etter molekylstørrelse. De separerte proteinene overføres til en membran og membranen blokkjes med Blotto for å unngå uspesifikk binding av antistoff til membranen. Et antistoff (primærantistoff) mot det proteinet man ønsker å detektere tilsettes. Deretter tilsettes et antistoff mot det første antistoffet (sekundærantistoff). Sekundærantistoffet er konjugert med enzymet "Horseradish Peroxidase" (HRP). For å detektere det spesifikke proteinet tilsettes et fluorescerende stoff Enhanced chemiluminescence" reagens (ECL) som danner et lysende kompleks med HRP og som dermed kan detekteres ved hjelp av eksponering av film og påfølgende fremkalling. Kvantifisering utføres ved å måle relativ lysintensitet til de ulike båndene som blir detektert under fremkalling. Westernblotting benyttes i denne oppgaven for å undersøke Akt/PKB, som er et sentralt signalmolekyl nedstrøms for insulinreseptoren i myotubene. Andelen (fosforylert/total) fosforylert Akt/PKB i myotubene etter forbehandling med insulin eller kontroll ble derfor undersøkt i de tre donorgruppene for å si noe om eventuelle forskjeller i insulinsensitiviteten.

### 2.7.1 Høsting av celler

Satelittceller ble proliferert og differensiert til myotuber i Biocoat falcon 25cm<sup>2</sup> flasker. Myotubene ble høstet på 7. differensieringsdag. Cellene ble stimulert med 100nM insulin i PBS-buffer tilsatt til dyrkningsmedium eller kun PBS-buffer (kontroll) tilsatt dyrkningsmedium i 15 minutter før høsting. Stimuleringen ble avsluttet ved at dyrkningsmedium ble fjernet og celle ble skylt med PBS-buffer 2x 2ml. Rester ble sugd av før 150 $\mu$ l 2x samplebuffer (appendiks 4.1) ble tilsatt. Cellene ble skrapet løs med en plastskrape og overført til nunc-rør som tålte koking. Prøvene ble kokt i 5 minutter for at proteinene skulle denaturere. 20 $\mu$ l ble tatt ut fra prøvene til proteinmåling. Deretter ble 10 %

$\beta$ -merkaptoetanol og 5 % bromfenylblått tilsatt prøvene for henholdsvis bryting av disulfidbindinger og farge. Prøvene ble kokt i ytterligere 5 minutter før de ble fryst ved -20°C.

### 2.7.2 Proteinmåling

Standardisert BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit fra Pierce ble benyttet. Uttaket av prøvene ble fortynnet 1:7 (5  $\mu$ l prøve i 30  $\mu$ l vann) i destillert vann og tilsatt 0,7 ml Pierce BCA protein assay reagent. Blandingen ble satt på vannbad; 60°C i 30 minutter. Det ble laget en standardkurve med BSA i ulike konsentrasjoner (0,5 mg/ml-3,5 mg/ml) som ble fortynnet, tilsatt reagens og satt på vannbad på samme måte som prøvene. Deretter ble prøver og standarder avkjølt og fordelt i en mikrotiterplater 300  $\mu$ l per brønn og 2 paralleller av hver. Proteinverdiene ble beregnet ved å måle prøvenes absorbans ved 590 nm på Wallac Victor<sup>TM</sup> mikroplateleser fra Perkin Elmer.

### 2.7.3 Gelelektroferese

12 % polyakrylamidgel (appendiks 4.2) ble støpt i glassformer og isobutanol ble tilsatt for å unngå bobler og ujevnheter i gelen. Gelen polymeriserte i 30 minutter før isobutanol ble fjernet og 4 % stacking gel (appendiks 4.3) ble laget og fylt opp i glassformen. Brønnkammer ble plassert før stackinggelen fikk polymerisere i 30 minutter. Gelene i glassformer ble plassert i elektroferesekaret før karet ble fylt opp med fortynnet (1:10) 10xTGS (Tris/Glycin/SDS) buffer fra BioRad. Brønnkammene ble forsiktig fjernet og volum av prøvene ble tilsatt i hver sin brønn slik at de tilsvarte samme proteinmengde (16,44 $\mu$ g protein, i to av prøvene: 6,24 $\mu$ g). 5  $\mu$ l standard (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards) ble tilsatt i en brønn på hver gel, denne standarden inneholder ulike proteiner med kjent molekylvekt slik at man kan estimere proteinvekten til proteiner man detekterer. Elektroferesen ble kjørt på 150V i ca 1 time.

### 2.7.4 Blotting

Gel fra elektroferesen ble overført til en blottemaskin, TE 70 ECL Semi-dry Transfer Unit fra Amersham Biosciences som benyttet Hoefers semi dry blotting. Proteiner fra prøvene og standardene ble overført fra gelen til en nitrocellulosemembran (Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup>) ved

hjelp av 32mA (per gel) i ca 1 time. Dette ble gjort for å gjøre proteinene tilgjengelige for deteksjon med antistoff.

### 2.7.5 Deteksjon og kvantifisering

Nitrocellulosemembran ble overført til et konet sentrifugerør og blokkert med Blotto (appendiks 4.5) i 1 time på rulle i romtemperatur for å forhindre uspesifikk antigen-binding til membranen. Primærantistoffet (tabell 2.5) fortynnet i Blotto ble tilsatt sentrifugerøret og inkubert over natt i kjølerom og overskudd ble deretter vasket av med T-TBS (appendiks 4.4). Sekundærantistoff (tabell 2.5) fortynnet i Blotto ble tilsatt og det ble inkubert i 1 time ved romtemperatur før overskuddet ble vasket av med T-TBS. ECL ble benyttet for å detektere de spesifikke proteinene. Nitrocellulosemembran ble inkubert i 1 minutt med ECL for deretter å bli overført til en filmkassett for eksponering og påfølgende fremkalling. Kvantifisering ble utført ved hjelp av dataprogrammet GeneTools from SynGene. Blottene ble skannet, og optisk tetthet av de ulike båndene på blottet ble målt.

**Tabell 2.5 Primær- og sekundær antistoffer til deteksjon av fosforylert og total Akt.**

Mål protein	Primærantistoff	Fortynning	Sekundærantistoff	Fortynning
Fosforylert Akt/PKB	Rabbit-antiPhospho-Akt	1:500	Goat-antirabbit	1:3000
Total Akt/PKB	Rabbit –antiAkt	1:500	Goat-antirabbit	1:3000

## 2.8 Statistiske analyser

Resultater i denne oppgaven presenteres, dersom noe annet ikke er oppgitt, som gjennomsnittsverdi i hver donorgruppe  $\pm$  standardfeil til gjennomsnittet (SEM). Gjennomsnittsverdien for hver donor er beregnet fra 4 paralleller i substratoksidasjon forsøkene og 2 paralleller i real-time PCR. n representerer antall donorer benyttet i forsøket, dette tallet varierer mellom 3-9 for hver donorgruppe i substratoksidasjon forsøkene, n= 3 for hver donorgruppe i RT-real-time PCR- og Westernblotting-forsøkene. Dataprogrammet SPSS ble benyttet til å gjennomføre interaksjonsanalyser ved hjelp av "linear mixed modell". Statistiske analyser ble gjennomført ved hjelp av tosidig Student's t-test i GraphPad Prism 5 og Microsoft office Excel. Hvis noe annet ikke er oppgitt har signifikansnivået  $\alpha= 0,05$  blitt benyttet i denne oppgaven. Korrelasjonsanalyse ble gjennomført ved hjelp av Pearson korrelasjon og Spearman's rho i dataprogrammet SPSS, det ble benyttet en tosidig t-test for beregning av p-verdien til korrelasjonskoeffisienten i samme dataprogram.

### 3. Resultater

#### 3.1 Donorkarakteristika

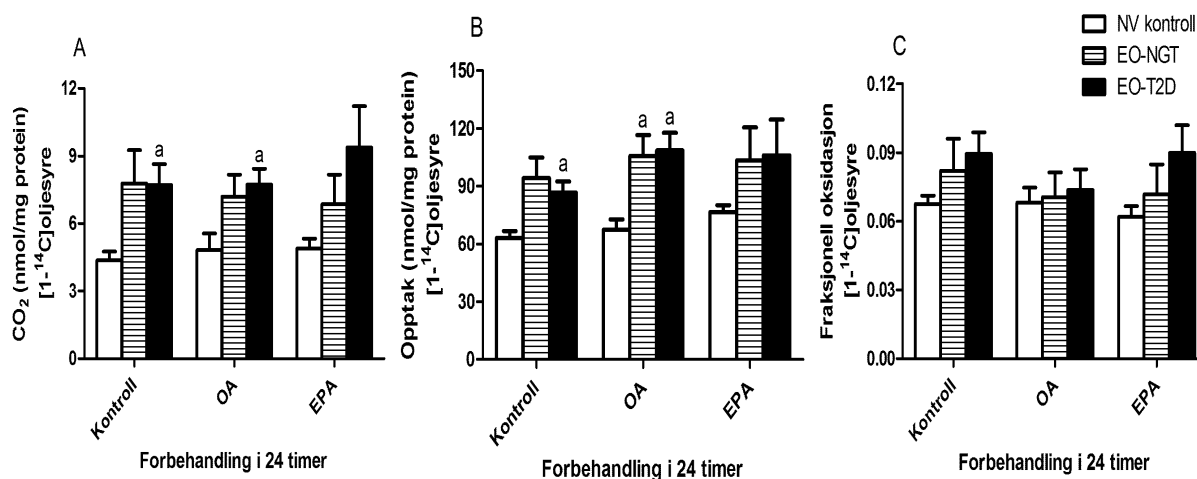
Det ble utført tosidig Student's t-test for å undersøke eventuelle forskjeller i donorkarakteristika mellom de tre ulike donorgruppene (tabell 2.1-2.3). EO-NGT og EO-T2D hadde statistisk signifikant høyere KMI og triacylglyserol-verdier i forhold til NV-kontrollene, men det var ingen forskjeller mellom de to EO-donorgruppene. EO-T2D-donorene hadde statistisk signifikant høyere fastende glukose-verdier i forhold til både NV-kontrolldonorene og EO-NGT-donorene. EO-T2D-donorene hadde en høyere gjennomsnittlig HbA1c-verdi enn EO-NGT-donorene. I forhold til alder fantes det ingen statistisk signifikante forskjeller, men EO-NGT så ut til å ligge noe lavere i gjennomsnittsalder enn de to andre gruppene.

#### 3.2 Myotubenes metabolske kapasitet

##### 3.2.1 Fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak, og effekt av forbehandling med ulike fettsyrer

Vi ønsket å undersøke og sammenligne de tre ulike donorgruppens basalkapasitet for fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon. Vi ville også undersøke om man kunne påvirke fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon i de ulike donorgruppene ved å forbehandle med ulike fettsyrer. ). Forbehandlingene bestod av umerket 100  $\mu$ M oljesyre (OA) eller eikosapentaensyre (EPA) tilsatt i dyrkningsmediet de siste 24 timer av differensieringsperioden. Basalkapasitet for fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon ble undersøkt med [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] OA (1  $\mu$ Ci/ml) over 4 timer, med en total fettsyrekonsentrasjon på 100  $\mu$ M (Figur 3.1 Basalkapasiteten til EO-NGT og EO-T2D gruppene så ut til å være høyere enn NV-kontroller med hensyn til både fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak (Figur 3.1A, B). Fettsyreoksidasjonen til EO-T2D er statistisk signifikant høyere enn verdien for NV-kontrollene både ved basalsituasjonen (ingen forbehandling) og ved forbehandling med OA (Figur 3.1A). Fettsyreopptaket til EO-T2D er statistisk signifikant høyere enn NV-kontroller

ved basalsituasjon, samtidig er fettsyreopptaket til begge EO-gruppene statistisk signifikant høyere enn NV-kontroller ved forbehandling med OA (Figur 3.1B). Det var ingen tydelige forskjeller i basalkapasiteten mellom de to EO-gruppene (Figur 3.1A, B). Forbehandling med OA og EPA påvirket ikke fettsyreoksidasjonen eller fettsyreopptaket i noen av de tre gruppene (Figur 3.1A, B). Det var små forskjeller både mellom de tre donorgruppene og mellom de ulike forbehandlingene med hensyn til fraksjonell fettsyreoksidasjon (Figur 3.1C).



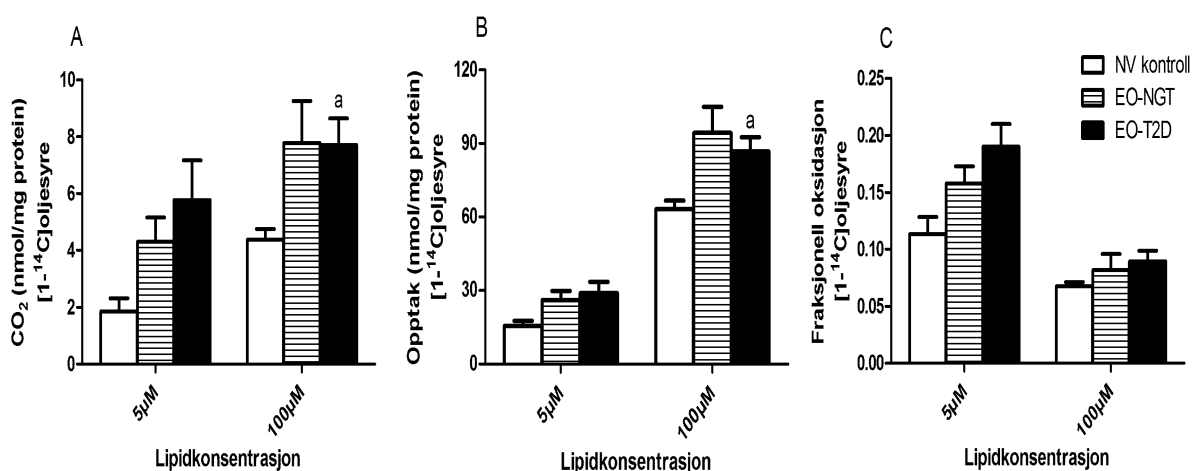
**Figur 3.1 Basalkapasitet for fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak og effekter av forbehandling med OA eller EPA.** Figuren viser de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D) i kontrollsituasjon (ingen forbehandling), forbehandlet med 100  $\mu$ M oljesyre (OA) eller eikosapentaensyre (EPA) i de 24 siste timer av differensieringsperioden. På forsøksdagen ble myotubene inkubert i 4 timer med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (1  $\mu$ Ci/ml), total fettsyrekonsentrasjon var 100  $\mu$ M i akuttmedium. A: Fettsyreoksidasjon, B: Fettsyreopptak, C: Fraksjonell oksidasjon. Data illustreres ved hjelp av gjennomsnitt  $\pm$  SEM, for de to EO-gruppene er  $n=5$ , for NV-kontroll-gruppen er  $n=9$ .  $a: P \leq 0,05$  mot NV-kontroll

### 3.2.2 Adapterbarhet

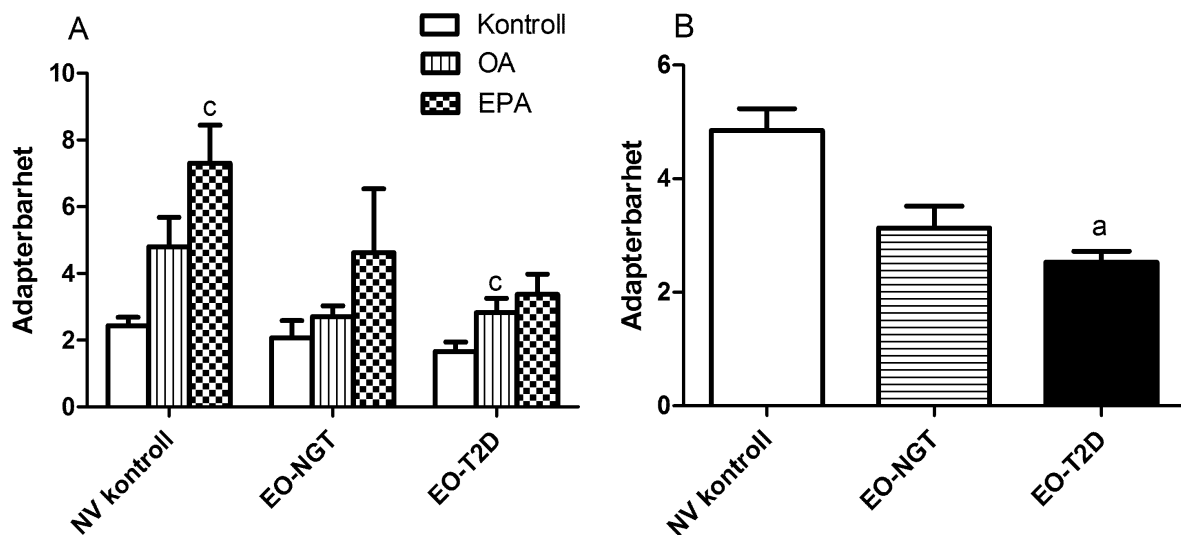
Videre ønsket vi å undersøke i hvor stor grad myotubene fra de ulike donorgruppene mestret å øke fettsyreopptaket og fettsyreoksidasjonen med økende tilgjengelig fettsyrekonsentrasjon. Dette ble målt ved å utsette myotubene fra hver donor for både 5  $\mu$ M og 100  $\mu$ M radioaktiv OA under forsøkene. Data fra disse forsøkene ble benyttet for beregning av adapterbarhet. Adapterbarhet ble beregnet ved hjelp av formelen: [oksidasjon av 100  $\mu$ M OA /oksidasjon av 5  $\mu$ M OA]. Som nevnt i forrige avsnitt lå basalkapasiteten til EO-gruppene høyere enn NV-kontrollene for både fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak når 100  $\mu$ M radioaktiv OA var tilsatt (Figur 3.2A, B). Det samme mønsteret så man når 5  $\mu$ M radioaktiv OA var tilsatt (Figur 3.2A, B). For fraksjonell fettsyreoksidasjon ser man det samme mønsteret som for absolutt fettsyreoksidasjon (Figur 3.2C). Forbehandling med OA



økte adapterbarheten til EO-T2D statistisk signifikant i forhold til ingen forbehandling i samme donorgruppe (Figur 3.3A), samtidig var det en tendens til økning av adapterbarheten hos NV-kontrollene. Forbehandling med EPA økte adapterbarheten til NV-kontrollene statistisk signifikant mot ingen forbehandling i samme donorgruppe, EPA tenderte til å øke adapterbarheten i forholdt til ingen forbehandling hos begge EO-gruppene også (Figur 3.3A). Det ble gjennomført en statistisk interaksjonsanalyse (linear mixed model (LMM), statistikkprogrammet SPSS), som viste at den relative forskjellen i oksidasjon for forbehandlingene innen hver donorgruppe ikke var forskjellig. Modellen tillot derfor at vi slo sammen data fra alle forbehandlingene, adapterbarheten var statistisk signifikant lavere for EO-T2D-donorene enn for celler fra NV-kontroller, EO-NGT donorene lå også lavere enn NV kontrollene (Figur 3.3B).



**Figur 3.2 Effekten av tilgjengelig høy eller lav oljesyrekonsentrasjon på fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak** Figuren viser de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D) med tilgjengelig [<sup>1-14</sup>C]oljesyre (1  $\mu$ Ci/ml eller 0,29  $\mu$ Ci/ml), total fettsyrekonsentrasjon 100  $\mu$ M eller 5  $\mu$ M OA i akuttmedium under 4 timers inkubering. A: Fettsyreoksidasjon, B: Fettsyreopptak, C: Fraksjonell oksidasjon. Data illustreres ved hjelp av gjennomsnitt  $\pm$ SEM, for de to EO-gruppene er n=5, for NV kontrollene er n=5-9. a:  $P \leq 0,05$  mot NV-kontroll

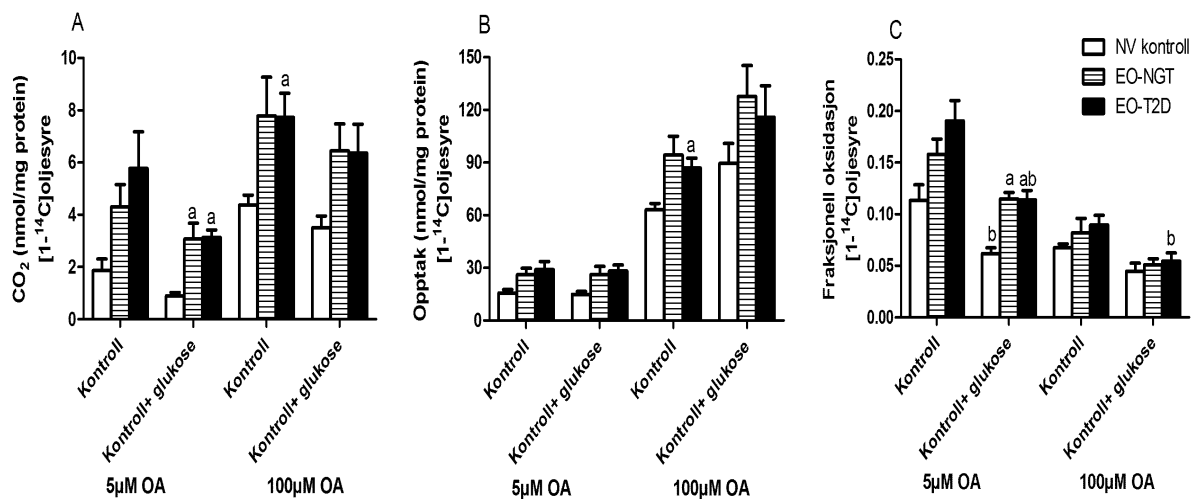


**Figur 3.3 Effekt av forbehandling med OA eller EPA på adapterbarhet og sammenligning av adapterbarhet mellom de tre donorgruppene.** Figuren viser adapterbarheten til de tre donorgruppene; normalvektige kontroll (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D). Adapterbarheten er beregnet ut fra fettsyreoksidasjonsdata, ved hjelp av formelen [oksidasjon ved 100  $\mu$ M OA/oksidasjon ved 5  $\mu$ M OA]. A: adapterbarheten til de tre donorgruppene i kontrollsituasjonen (ingen forbehandling) og etter forbehandling med 100  $\mu$ M oljesyre (OA) eller eikosapentaensyre (EPA) de siste 24 timer av differensieringsperioden. B: samledata for hver donorgruppe uavhengig av forbehandling. Data illustreres ved hjelp av gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n=5$  for alle tre gruppene. a:  $P \leq 0,05$  mot NV-kontroll, c:  $P \leq 0,05$  mot kontroll (ingen forbehandling) i hver donorgruppe.

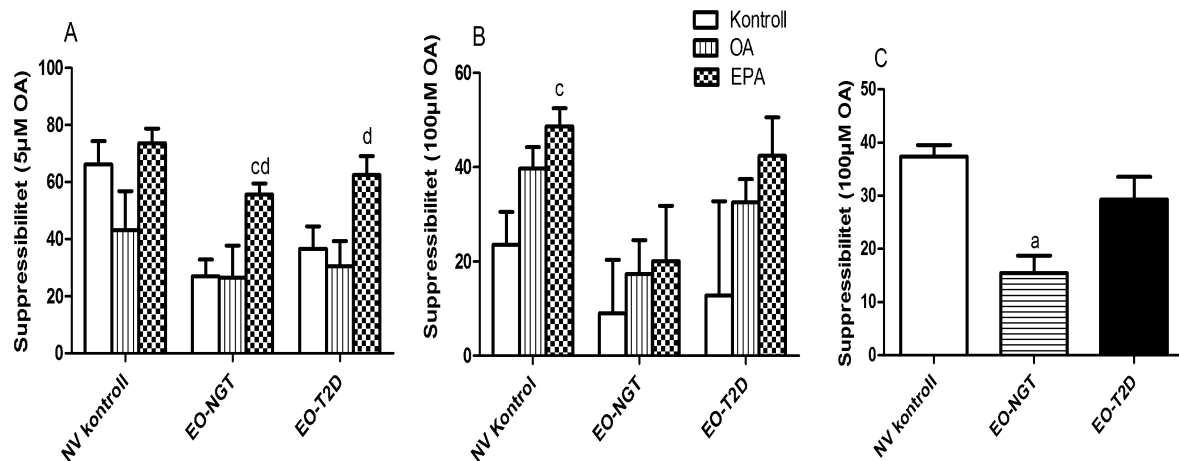
### 3.2.3 Suppressibilitet

Metabolsk fleksibilitet innebærer å skifte fra fettsyreoksidasjon ved faste til glukoseoksidasjon etter måltid, det vil si at nærvær av glukose under forsøk bør dermed kunne undertrykke fettsyreoksidasjonen hos myotubene i de tre donorgruppene [43, 44, 48]. Vi ønsket å undersøke om de tre donorgruppene viste forskjellige tendenser til undertrykking av fettsyreoksidasjonen ved akutt tilstedeværelse av glukose både ved lav og høy konsentrasjon av OA. For å undersøke dette ble myotubene eksponert for 5 mM glukose eller ingen glukose under fettsyreoksidasjon. I tillegg ble myotubene utsatt for [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] OA (1  $\mu$ Ci/ml eller 0,29  $\mu$ Ci/ml), total fettsyrekonsentrasjon 100  $\mu$ M eller 5  $\mu$ M. Data fra disse forsøkene ble benyttet til å beregne suppressibilitet. Suppressibilitet ble beregnet ved hjelp av formelen  $[(1 - (\text{oksidasjon av OA med 5 mM glukose} / \text{oksidasjon av OA uten glukose})) \times 100 \text{ \%}]$ . EO-gruppene ligger noe høyere i oksidasjon både med og uten glukose til stede, og ved begge fettsyrekonsentrasjonene (Figur 3.4A). Fettsyreoksidasjon tenderte til å bli redusert med glukose tilstede i alle gruppene og ved begge fettsyrekonsentrasjonene (Figur 3.4A). Fettsyreopptaket fulgte det samme mønsteret som fettsyreoksidasjonen, hvor EO-gruppene lå

noe høyere enn NV-kontrollene både uten og med glukose til stede, og ved begge fettsyrekonsentrasjonene (Figur 3.4B). For fraksjonell fettsyreoksidasjon var det en tendens til at mindre av den fettsyren som ble tatt opp i cellen ble oksidert når glukose var tilstede, både ved lav og høy OA konsentrasjon (Figur 3.4C). Den fraksjonelle fettsyreoksidasjonen for både NV-kontroller og EO-T2D var statistisk signifikant lavere når glukose var tilstede i forhold til uten glukose tilstede ved 5  $\mu\text{M}$  fettsyrekonsentrasjon, det samme gjaldt for EO-T2D ved 100  $\mu\text{M}$  OA konsentrasjon (Figur 3.4C). Suppressibilitet ble undersøkt i kontrollsituasjonen (ingen forbehandling) og ved forbehandling med OA eller EPA de 24 siste timer av differensieringsperioden. EPA viste tendens til å øke suppressibilitet både ved 5  $\mu\text{M}$  OA konsentrasjon og ved 100  $\mu\text{M}$  OA konsentrasjon, det så også ut til at EPA hadde tendens til å øke suppressibilitet i alle tre donorgruppene (Figur 3.5A, B). Det var i midlertidig vanskelig å si noe sikkert ettersom det var stor spredning på dataene for 100  $\mu\text{M}$  OA. Det ble gjennomført en statistisk interaksjonsanalyse og denne analysen viste at den relative forskjellen i oksidasjon for forbehandlingene innen hver donorgruppe ikke var forskjellig. Modellen tillot derfor at vi slo sammen data fra alle forbehandlingene, suppressibiliteten var statistisk signifikant lavere for EO-NGT donorene enn for NV-kontrollene, EO-T2D donorene lå også lavere enn NV-kontrollene (Figur 3.5C).



**Figur 3.4 Effekt av glukosetilsetning på fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak ved 5  $\mu\text{M}$  og 100  $\mu\text{M}$  OA** Figuren viser de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D) med ingen glukose eller 5 mM glukose tilsatt i tillegg til [<sup>1-<sup>14</sup>C</sup>]fetsyresyre (1  $\mu\text{Ci/ml}$  eller 0,29  $\mu\text{Ci/ml}$ ), total fettsyrekonsentrasjon 100  $\mu\text{M}$  eller 5  $\mu\text{M}$ , i akuttmedium under inkubering i 4 timer. A: Fettsyreoksidasjon, B: Fettsyreopptak, C: Fraksjonell oksidasjon. Data er illustrert med gjennomsnitt og  $\pm\text{SEM}$ , for de to EO-gruppene er  $n=5$ , for NV-kontroll-gruppen er  $n=5-9$ . a:  $P \leq 0,05$  mot NV-kontroll, b:  $P \leq 0,05$  mot kontroll uten glukose i hver donorgruppe.



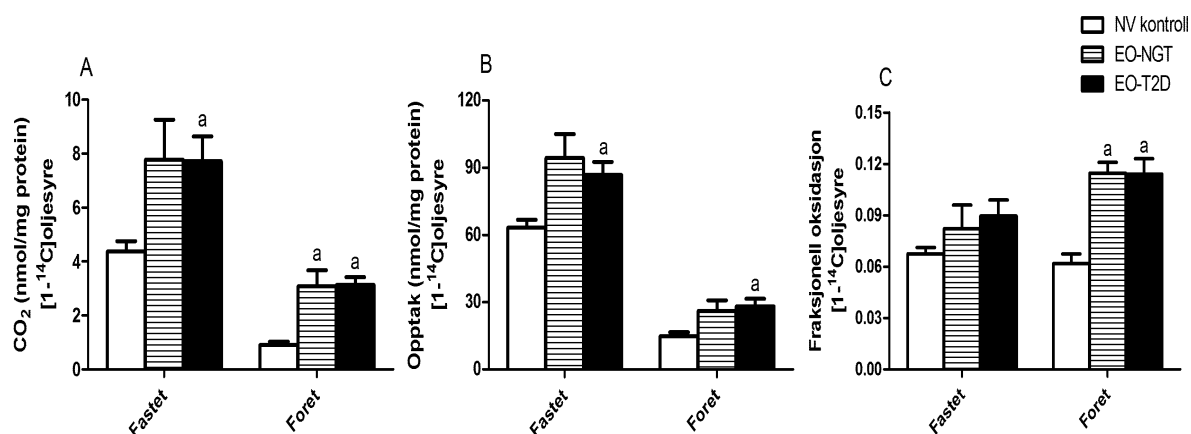
**Figur 3.5 Effekt av forbehandling med OA eller EPA på suppressibiliteten ved 5 μM OA eller 100 μM OA og sammenligning av suppressibiliteten i de tre donorgruppene.** Figuren viser suppressibiliteten hos de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D). Suppressibilitet er beregnet fra fettsyreoksidasjonsdata ved 5 μM og 100 μM fettsyrekonsentrasjon, ved hjelp av formelen:  $[(1 - (\text{oksidasjon av OA med 5 mM glukose} / \text{oksidasjon av OA uten glukose})) \times 100 \%$ ]. A: suppressibilitet hos de tre donorgruppene ved 5 μM OA i kontrollsituasjon (ingen forbehandling) og etter forbehandling med 100 μM oljesyre (OA) eller eikosapentaensyre (EPA) de siste 24 timer av differensieringsperioden. B: suppressibilitet hos de tre donorgruppene ved 100 μM OA i kontrollsituasjon (ingen forbehandling) og etter forbehandling med 100 μM oljesyre (OA) eller eikosapentaensyre (EPA) de siste 24 timer av differensieringsperioden. C: samledata for hver donorgruppe uavhengig av forbehandling. Data er illustrert med gjennomsnitt  $\pm$  SEM, n=5 for alle gruppene. a:  $P \leq 0,05$  mot NV-kontroll, c:  $P \leq 0,05$  mot kontroll (ingen forbehandling) i hver donorgruppe, d:  $P \leq 0,05$  mot forbehandling med OA i hver donorgruppe.

### 3.2.4 Substratregulert fleksibilitet

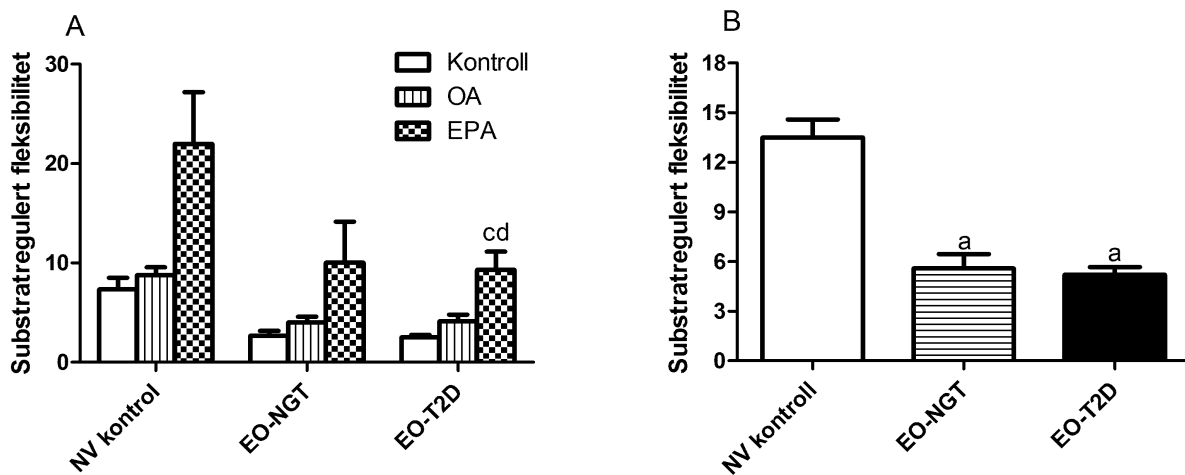
Vi ønsket å undersøke eventuelle forskjeller i opptak og oksidasjon hos de tre donorgruppene ved skifte fra en foret situasjon med lav fettsyrekonsentrasjon og høy glukosekonsentrasjon til en fastet situasjon med høy fettsyrekonsentrasjon, uten glukose til stede. Dette ble undersøkt ved å eksponere myotubene fra hver donor for både fastet (100 μM OA uten glukose) og foret situasjon (5 μM OA + 5 mM glukose) under 4 timers inkubering. Data fra disse forsøkene ble benyttet for å beregne den substratregulerte fleksibiliteten.

Substratregulert fleksibilitet ble beregnet ved hjelp av formelen  $[\text{oksidasjon av OA med 5 μM OA + 5 mM glukose} / \text{oksidasjon av OA med 100 μM OA}]$ . De to EO-gruppene hadde tendens til høyere fettsyreoksidasjon enn NV-kontroll-gruppen både ved fastet og foret situasjon (Figur 3.6A). Det samme mønsteret fant man igjen i fettsyreopptaket, men trendene her var mindre tydelige (Figur 3.6B). For den fraksjonelle fettsyreoksidasjonen hadde EO-donorene tendens til høyere verdier enn NV-kontrollene i foret situasjon, men forskjellen mellom gruppene var betydelig mindre i fastet situasjon (Figur 3.6C). Den substratregulerte

fleksibiliteten ble undersøkt i kontrollsituasjon (ingen forbehandling) og etter forbehandling med 100  $\mu$ M OA eller EPA de siste 24 timer av differensieringsperioden (Figur 3.7A). Forbehandlingen med OA utgjorde ingen forskjell i substratregulert fleksibilitet i forhold til kontrollsituasjonen hos noen av donorgruppene (Figur 3.7A). Forbehandlingen med EPA tenderte til å øke den substratregulerte fleksibiliteten i forhold til kontrollsituasjonen for alle de tre donorgruppene (Figur 3.7A). Det ble gjennomført en statistisk interaksjonsanalyse, og denne analysen viste at den relative forskjellen i fettsyreoksidasjon for forbehandlingene innen hver donorgruppe ikke var forskjellig. Modellen tillot derfor at vi slo sammen data for alle forbehandlingene, og suppressibiliteten var nå statistisk signifikant mindre for de to EO-gruppene enn for NV-kontrollene (Figur 3.7B).



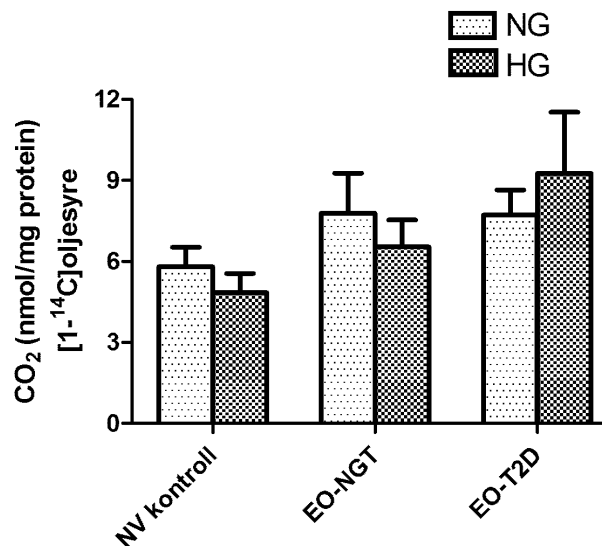
**Figur 3.6 Effekt av endring fra fastet til foret-situasjon på fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak**  
Figuren viser de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D) med tilsatt total fettsyrekonsentrasjon på 100 $\mu$ M oljesyre (OA) eller 5 $\mu$ M OA + 5mM glukose under inkubering i 4 timer. A: Fettsyreoksidasjon, B: Fettsyreopptak, C: Fraksjonell oksidasjon. Data er illustrert med gjennomsnitt  $\pm$ SEM, for de to EO-gruppene er  $n=5$ , for NV kontroll-gruppen er  $n=5-9$ . a:  $P \leq 0,05$  mot NV-kontroll



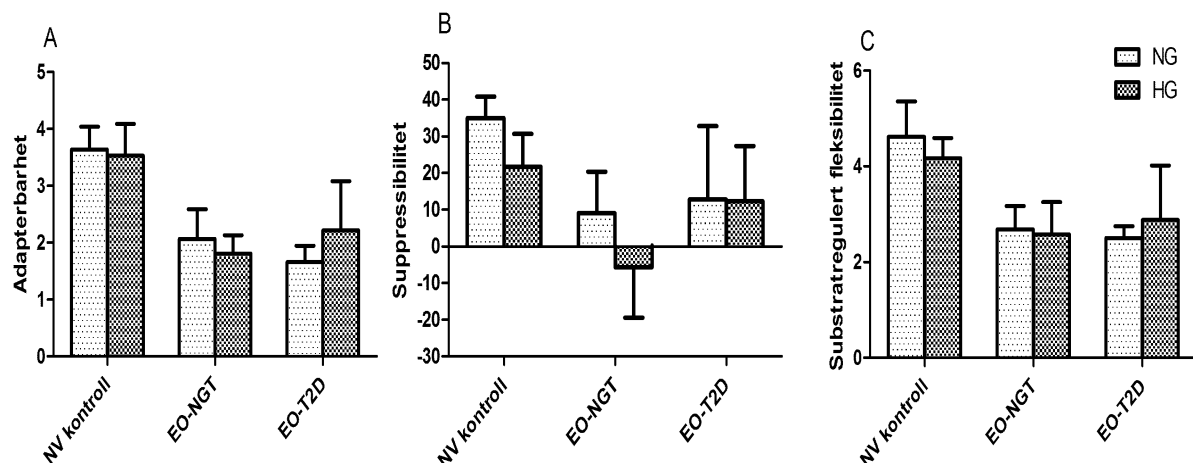
**Figur 3.7 Effekten av forbehandling med OA eller EPA på substratregulert fleksibilitet og sammenligning av substratregulert fleksibilitet i de tre donorgruppene** Figuren viser de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D). Substratregulert fleksibilitet er beregnet fetttsyreoksidasjonsdata, ved hjelp av formelen: [oksidasjon av 5µM OA+ 5mM glukose/ oksidasjon av 100µM OA]. A: substratregulert fleksibilitet hos de tre donorgruppene i kontrollsituasjon (ingen forbehandling) og etter forbehandling med 100 µM oljesyre (OA) eller eikosapentaensyre (EPA) de siste 24 timer av differensieringsperioden. B: samlet data for hver donorgruppe uavhengig av forbehandling. Data er illustrert med gjennomsnitt ±SEM, n=5, for alle gruppene. a:  $P \leq 0,05$  mot NV-kontroll, c:  $P \leq 0,05$  mot kontroll (ingen forbehandling) i hver donorgruppe, d:  $P \leq 0,05$  mot forbehandling med OA i hver donorgruppe.

### 3.2.5 Effekt av kronisk høy glukose på myotubenes fetttsyreoksidasjon, fetttsyreopptak og metabolske fleksibilitet

Tidligere studier har vist at kronisk hyperglykemi fører til redusert substratoksidasjon og nedsatte metabolsk fleksibilitet i humane myotuber fra normalvektige donorer [56]. Vi ønsket å undersøke om EO-gruppene reagerte på samme måte som NV-kontrollene på kronisk hyperglykemi. Dette ble undersøkt ved å eksponere myotubene for høy glukose (20mM glukose, HG) eller normal glukose (5mM glukose, NG) de 4 siste døgnet av differensieringsperioden. For å kunne beregne metabolske fleksibilitetsparametere ble myotubene eksponert for ingen eller 5mM glukose akutt sammen med  $[1-^{14}\text{C}]$ OA (1 µCi/ml eller 0,29 µCi/ml), total fetttsyrekonsentrasjon på 100 µM eller 5 µM på forsøksdagen. HG ga ingen tydelige effekter på fetttsyreoksidasjonen i forhold til NG (Figur 3.8A). Det var heller ingen tydelige effekter på fetttsyreopptak eller fraksjonell fetttsyreoksidasjon (data ikke vist). Parametrene for metabolsk fleksibilitet ble beregnet som nevnt ovenfor, men det var ingen tydelige forskjeller på parametrene ved HG og NG (Figur 3.9 A-C). Man så i midlertidig det samme mønsteret som over, begge EO-donorgruppene lå lavere enn NV-kontrollene på alle de tre parametrene for metabolsk fleksibilitet.



**Figur 3.8 Effekt av kronisk høy glukose på fetttsyreoksidasjon.** Figuren viser fetttsyreoksidasjon hos de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D) hvor myotubene er utsatt for normal glukose (5mM glukose, NG) og kronisk høy glukose (20mM glukose, HG) i de 4 siste døgn av differensieringsperioden. Total fetttsyrekonsentrasjon i akuttmedium under inkubering i 4 timer var 100μM. Data er illustrert med gjennomsnitt ±SEM, for de to EO-gruppene er n=5, for NV-kontroll-gruppen er n=3.



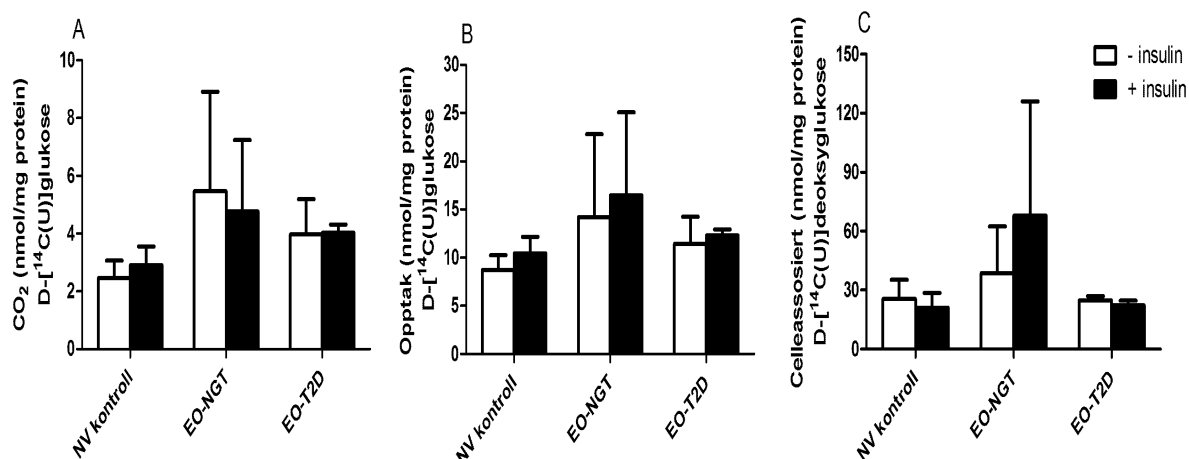
**Figur 3.9 Effekt av kronisk høy glukose på parametre for metabolsk fleksibilitet.** Figuren viser de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D) hvor myotubene er utsatt for normal glukose (5mM glukose, NG) og kronisk høy glukose (20mM glukose, HG) i de 4 siste døgn av differensieringen. A: Adapterbarhet ble beregnet fra fetttsyreoksidasjonsdata ved hjelp av formelen: [oksidasjon av OA med 100μM OA tilstedet/oksidasjon av OA med 5μM OA tilstedet]. B: Suppressibilitet ble beregnet fra fetttsyreoksidasjonsdata ved hjelp av formelen:  $[(1 - (\text{oksidasjon av OA med 5mM glukose} / \text{oksidasjon av OA uten glukose})) \times 100 \text{ \%}]$ . C: Substratregulert fleksibilitet ble beregnet fra fetttsyreoksidasjonsdata ved hjelp av formelen:  $[(\text{oksidasjon av OA med 5μM OA} + 5\text{mM glukose tilstedet}) / \text{oksidasjon av OA med 100μM OA tilstedet}]$ . For de to EO-gruppene er n=5, for NV-kontroll-gruppen er n=3.

### 3.2.6 Glukseoksidasjon og glukseopptak, og effekter av insulin

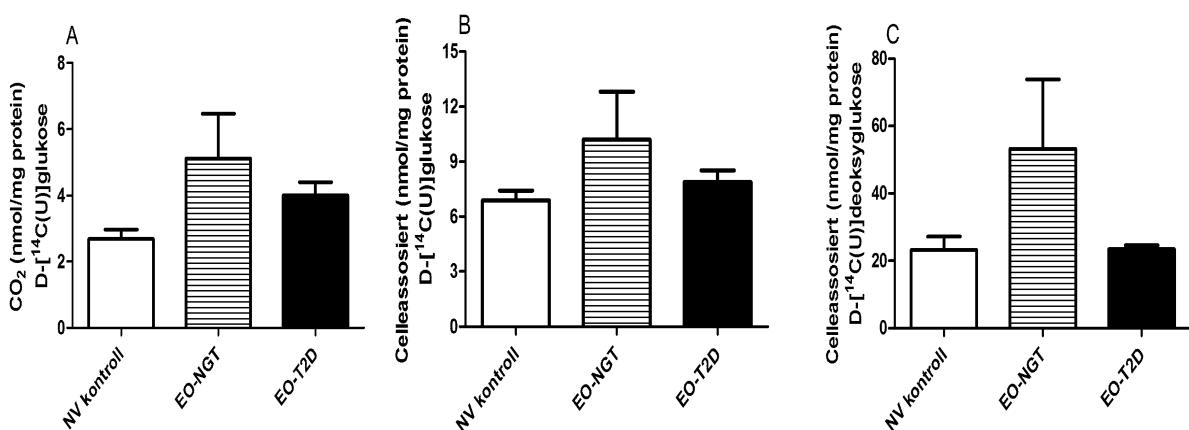
Vi ønsket å undersøke basalkapasiteten for glukseoksidasjon og glukseopptak i myotubene fra de tre ulike donorgruppene. I tillegg var det interessant å undersøke om insulinstimulering hadde noen effekt på glukseoksidasjonen og glukseopptaket. Substratoksidasjonsforsøk med D-[14C (U)]glukse (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) og opptak av [U- $^{14}\text{C}$ ]D-deoxyglukse (DOG) (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) ble benyttet for å undersøke dette. D-[14C (U)]DOG er i tidligere forsøk vist å bli tatt opp via de samme mekanismene som glukse uten at isotopen metaboliseres.

Myotubene fikk tilført D-[14C (U)]glukse (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 111  $\mu\text{M}$  eller D-[14C (U)]DOG (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 100  $\mu\text{M} \pm 100 \text{ nM}$  insulin i akuttmediet på forsøksdagen. Glukseoksidasjonen tenderte til å være noe høyere for begge gruppene med EO-donorer, men stor spredning i dataene gjør det vanskelig å si noe sikkert (Figur 3.10A). Glukseopptaket så også ut til å ligge noe høyere for EO-donorene, men også her gjør spredningen av dataene det vanskelig å si noe sikkert (Figur 3.10B). Glukseopptaket undersøkt ved hjelp av D-[14C (U)]DOG viste det samme mønsteret for EO-NGT som ligger noe høyere enn NV-kontroll-gruppen, men spredning i dataene gjør det vanskelig å si noe sikkert (Figur 3.10C). EO-T2D ser ut til å ha omtrent det samme opptaket som NV-kontroll-gruppen (Figur 3.10C). Insulin hadde ingen effekt på glukseopptaket og glukseoksidasjonen, dette gjaldt for alle tre donorgruppene (Figur 3.10). Dataene  $\pm$  insulin ble derfor slått sammen til ett gjennomsnitt per donorgruppe (Figur 3.11). Det ble da tydeligere at begge EO-gruppene hadde en høyere glukseoksidasjon enn NV-kontroll-gruppen (Figur 11A). Glukseopptaket både utført med D-[14C (U)]glukse og D-[14C (U)]DOG så ut til å være likt for NV-kontroll-gruppen og EO-T2D-gruppen (Figur 3.11B, C). EO-NGT lå noe høyere enn NV-kontroller og EO-T2D i glukseopptak, men spredningen i dataene gjør det vanskelig å si noe sikkert.





**Figur 3.10 Effekt av insulin på glukoseoksidasjon og glukoseopptak** Figuren viser de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D) eksponert for D-[<sup>14</sup>C(U)]-glukose (1  $\mu$ Ci/ml), 111  $\mu$ M eller D-[<sup>14</sup>C(U)] deoksyglukose (DOG) (1  $\mu$ Ci/ml), 100  $\mu$ M og  $\pm$  100nM insulin i akuttmedium på forsøksdagen. A: Glukoseoksidasjon, B: Glukoseopptak, C: DOG-opptak. Data er illustrert med gjennomsnitt  $\pm$  SEM, n=3 for alle gruppene..

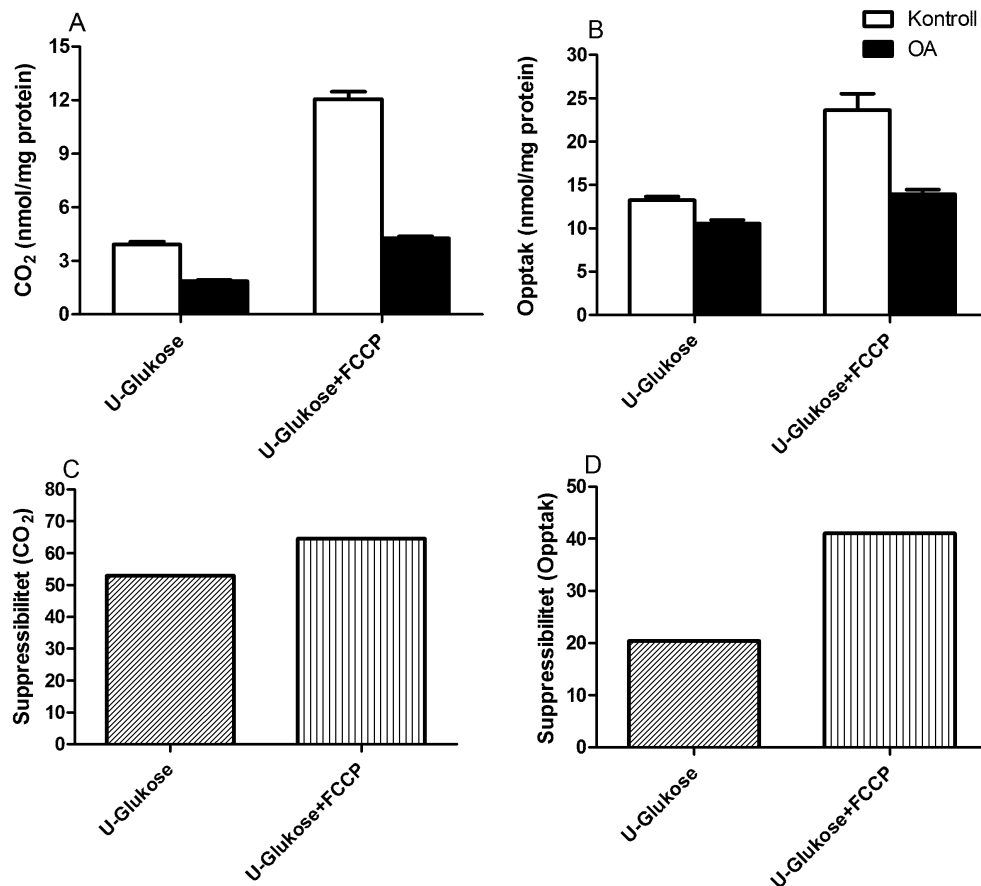


**Figur 3.11 Basalkapasitet for glukoseoksidasjon og glukoseopptak.** Figuren viser gjennomsnittsverdier for forsøk gjort  $\pm$  100 nM insulin tilsatt for de tre donorgruppene; normalvektige kontroller (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D). Myotubene ble eksponert for D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (1  $\mu$ Ci/ml), 111  $\mu$ M eller D-[<sup>14</sup>C]deoksyglukose (DOG) (1  $\mu$ Ci/ml), 100  $\mu$ M. A: Glukoseoksidasjon, B: Glukoseopptak, C: DOG-opptak. Data er illustrert med gjennomsnitt  $\pm$  SEM, n=3 for alle gruppene. Grafene viser.

### 3.2.7 Effekt av akutt tilstedeværelse av fettsyre på glukoseoksidasjon og glukoseopptak

Etter som glukose undertrykket lipidoksidasjonen ved sitt nærvær (Figur 3.4) var det ønskelig å undersøke om fettsyre også kunne undertrykke glukoseoksidasjonen. I tidligere studier [56] har man ikke fått frem fettsyre-suppresjonen på glukoseoksidasjon under basale betingelser, men kun ved bruk av mitokondrielle avkobler som karbonylcyanid p-trifluormetoksyfenylhydrazon (FCCP). Myotubene fra en donor ble eksponert for D-[<sup>14</sup>C

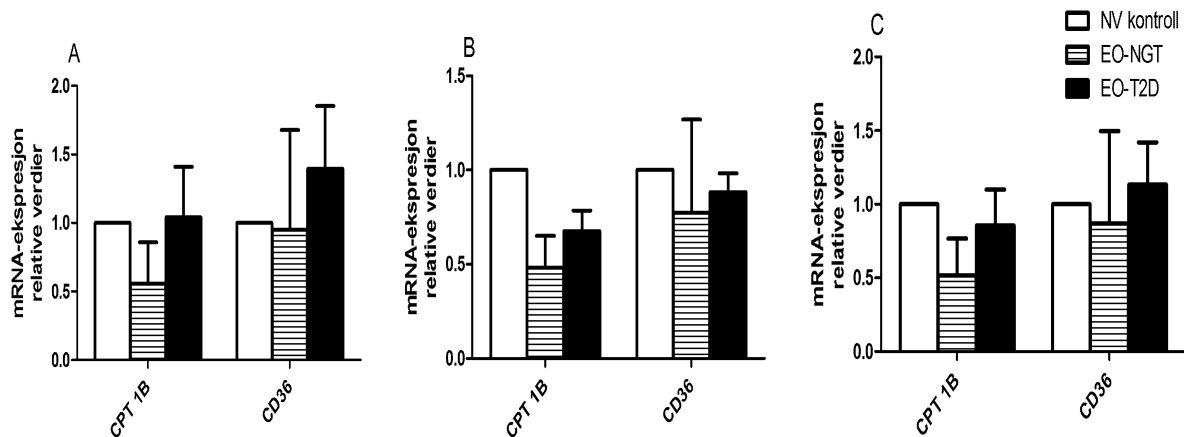
(U)]glukose (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 111  $\mu\text{M}$  og  $\pm 1\mu\text{M}$  FCCP i akuttmediet på forsøksdagen. I tillegg til FCCP ble myotubene enten tilsatt 100  $\mu\text{M}$  OA eller ingen fettsyre (kontroll). Suppressibilitet ble beregnet ut fra data fra disse forsøkene ved hjelp av formelen:  $[\text{glukoseoksidasjon med OA}/\text{glukoseoksidasjon uten OA}] \pm \text{FCCP}$ . Glukoseoksidasjonen ble tydelig redusert ved akutt tilsetning av OA, både med og uten FCCP til stede. Suppressjonen var størst med FCCP til stede (Figur 3.12A, C). Glukoseopptaket ble redusert ved tilsetning av OA, både med og uten FCCP, suppressjonen var størst med FCCP til stede (Figur 3.12B, D). OA førte til en 53 % suppressjon av glukoseoksidasjonen under basal betingelser og 65 % suppressjon ved tilstedeværelse av FCCP (Figur 3.12C). OA førte til en 20 % suppressjon av glukoseopptak under basal betingelser og 41 % suppressjon ved tilstedeværelse av FCCP (Figur 3.12D).



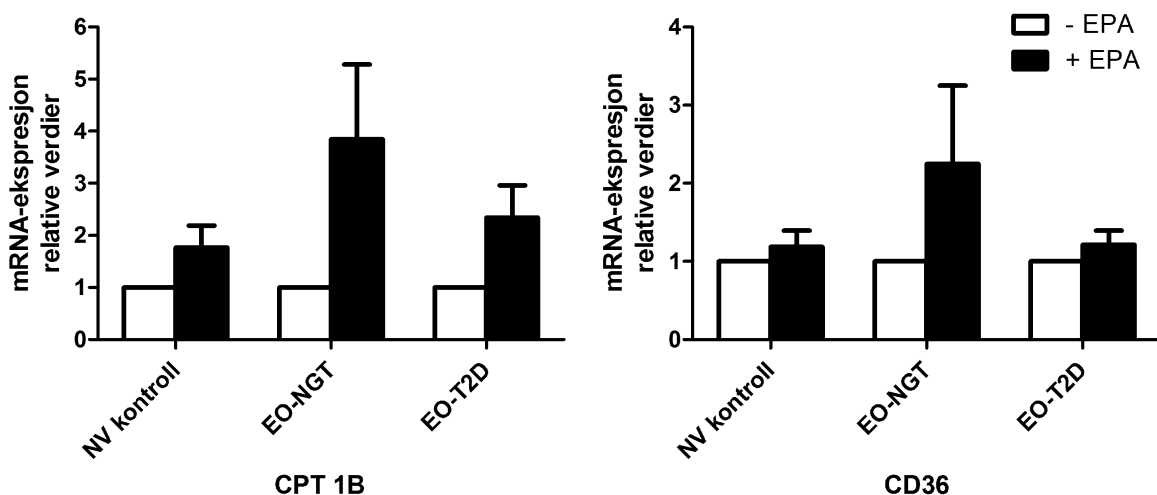
**Figur 3.12 Suppressjon forårsaket av fettsyre på glukoseoksidasjon og glukoseopptak.** Figuren viser data fra forsøk på myotuber fra en ekstremt overvektig donor med type 2-diabetes. Myotubene er eksponert for D-[ $^{14}\text{C}$ (U)]glukose (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 111  $\mu\text{M}$ ,  $\pm 1\mu\text{M}$  karbonylcyanid p-trifluormetoksyfenylhydrazon (FCCP) og  $\pm 100\mu\text{M}$  oljesyre (OA) i 4 timer under inkubering. A: Glukoseoksidasjon, B: Glukoseopptak. Data er illustrert med gjennomsnitt  $\pm$  SEM. C: Suppressibilitet  $[(1-(\text{glukoseoksidasjon med } 100\mu\text{M OA tilstedet}/\text{glukoseoksidasjon uten OA tilstedet (kontroll)))] \times 100\%$  ble beregnet for glukoseoksidasjonsdata  $\pm$  FCCP tilstedet D: Suppressibilitet  $[(1-(\text{glukoseoksidasjon med } 100\mu\text{M OA tilstedet}/\text{glukoseoksidasjon uten OA tilstedet (kontroll)))] \times 100\%$  ble beregnet for glukoseopptaksdata  $\pm$  FCCP tilstedet.  $n=1$ .

### 3.3 Genuttrykk av CPT 1B og CD36 og effekt av forbehandling med EPA

CPT 1B og CD36 er viktige regulatorer av henholdsvis fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak. I lys av resultatene vist over var det derfor interessant å undersøke genuttrykk av disse to genene i de tre donorgruppene. Genuttrykket ble undersøkt i kontrollsituasjonen (ingen forbehandling) og etter forbehandling med EPA siste 24 timer av differensieringsperioden. RT-real-time-PCR ble benyttet for å undersøke dette. Alle resultatene er oppgitt i relative verdier korrigert for en av de endogene kontrollene 36B4 (Figur 3.13A) eller GAPDH (Figur 3.13B) eller et gjennomsnitt av de to (Figur 3.13C og figur 3.14). Resultatene i figur 3.13 er normalisert mot NV-kontroll innenfor hvert gen. Resultatene i figur 3.14 er normalisert mot ingen forbehandling (kontroll) innenfor hver donorgruppe. Resultatene viser ingen markante forskjeller i uttrykket av CPT 1B mellom de tre donorgruppene (figur 3.13). Det kan se ut til at EO-NGT har tendens til lavere uttrykk enn de to andre gruppene. EO-T2D ligger også lavere enn NV-kontroller (figur 3.13C), men spredningen på resultatene er for stor til at man kan trekke noen slutninger. EO-T2D tenderer til høyere uttrykk av CD36 enn de to andre donorgruppene (figur 3.13C), men også her er spredningen i dataene for stor til å kunne konkludere med noe. EPA økte mRNA-ekspresjonen av begge genene i alle tre donorgruppene (figur 3.14). Det kan se ut som om EO-NGT hadde den største relative økningen av de tre gruppene mens NV-kontroller og EO-T2D hadde relativt lik økning, men datamaterialet var for lite til å beregne statistikk.



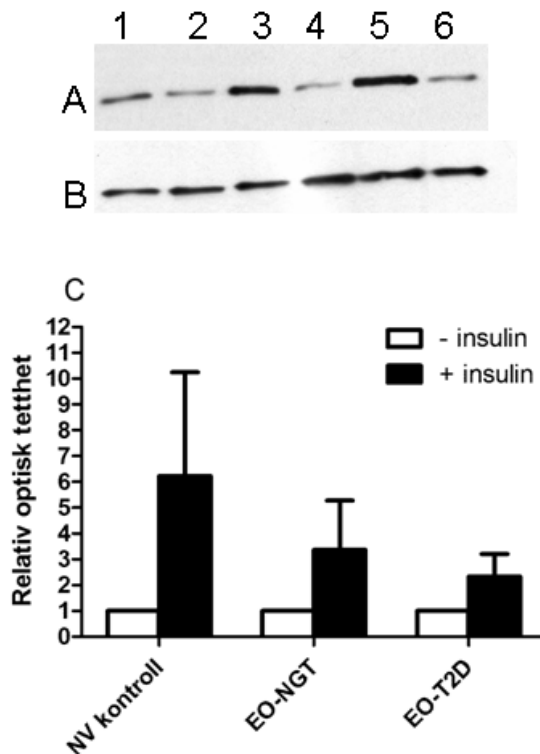
**Figur 3.13 Basalt genuttrykk av CPT 1B og CD36** Figuren viser mRNA-ekspressjon i de tre donorgruppene; normalvektige kontroll (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D) for genene carnitin palmitoyltransferase 1 (CPT 1B) og cluster of differentiation 36 (CD36). A: relative data korrigert for endogen kontroll 36B4, B: relative data korrigert for endogen kontroll GAPDH, C: relative data korrigert for gjennomsnitt av 36B4 og GAPDH. Alle data er normalisert mot NV-kontroll for hvert gen (satt til 1) og data er illustrert med gjennomsnitt  $\pm$ SEM,  $n=3$  for NV-kontroller og EO-T2D,  $n=2$  for EO-NGT.



**Figur 3.14 Effekt av forbehandling med EPA på mRNA-ekspressjon av CPT 1B og CD36** Figuren viser mRNA-ekspressjon i de tre donorgruppene; normalvektige kontroll (NV-kontroll), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med etablert type 2 diabetes (EO-T2D). A: mRNA-ekspressjon av carnitin palmitoyltransferase 1 (CPT 1B) i kontrollsituasjon (ingen forbehandling) og ved forbehandling med eikosapentaensyre (EPA) i de siste 24 timer av differensieringsperioden. B: mRNA-ekspressjon av cluster of differentiation 36 (CD36) i kontrollsituasjon (ingen forbehandling) og ved forbehandling med eikosapentaensyre (EPA) i de siste 24 timer av differensieringsperioden. Alle resultater oppgis som relative data korrigert for gjennomsnitt av endogen kontroll 36B4 og GAPDH, alle data er normalisert mot ingen forbehandling (kontroll) for hver donorgruppe (satt til 1), data er illustrert med gjennomsnitt  $\pm$ SEM,  $n=3$  for NV-kontroller og EO-T2D,  $n=2$  for EO-NGT.

### 3.4 Deteksjon av fosforylert Akt ved hjelp av Westernblotting

Akt er et sentralt signalmolekyl nedstrøms for insulinreseptoren som blant annet er involvert i regulering av GLUT4-translokering. Fosforylering er nødvendig for aktivering av Akt, og dermed nødvendig for at Akt skal igangsette intracellulære signalveier. Ved å måle både total og fosforylert Akt kan det dannes et bilde av hvor stor insulinresponsen i myotuben er, ettersom man kan si noe om hvor stor andel av total Akt som fosforyleres. Westernblotting av total og fosforylert Akt ble benyttet i denne oppgaven for å undersøke eventuelle forskjeller i insulinstimulert fosforylering av Akt mellom de tre donorgruppene. Myotubene ble stimulert med PBS (kontroll) eller 100 nM insulin i 15 minutter før høsting. Det ble gjennomført forsøk på tre donorer i hver av de tre donorgruppene, men lesbart blott ble kun funnet for to donor fra hver donorgruppe. Resultater fra målingene av optisk tetthet ble benyttet til å beregne ratio av andelen fosforylert Akt av total Akt i myotubene. Dette ble beregnet ved hjelp av formelen:  $\text{[optisk tetthet av fosforylert Akt-bånd/optisk tetthet av total Akt-bånd]}$ . Resultatene i figur 3.15C er oppgitt i relative verdier hvor kontroll uten insulin i hver donorgruppe er satt til 1. Ettersom datamaterialet er så lite er det vanskelig å trekke noen slutninger rundt disse resultatene. Det kan imidlertid se ut til at den relative insulinstimulerte Akt-fosforyleringen er lavere for de to gruppene med EO-donorer i forhold til NV-donorene (figur 3.15C).



**Figur 3.15 Deteksjon av insulinstimulert fosforylert Akt** Myotubene ble stimulert med PBS (kontroll) eller 100 nM insulin i 15 minutter før høsting. Westernblotting ble utført med antistoff rettet mot fosforylert Akt eller total Akt. Figuren viser A: Et av to forsøk med antistoff rettet mot fosforylert Akt. B: Samme forsøk som i A, med antistoff rettet mot total Akt. Brønn 1, 3 og 5 er henholdsvis NV-kontroll, EO-NGT, EO-T2D med insulin. Brønn 2, 4 og 6 er henholdsvis NV-kontroll, EO-NGT, EO-T2D uten insulin. C: Ratio fosforylert Akt /total Akt. Data er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM og oppgitt i relative verdier hvor kontroll uten insulin i hver donorgruppe er satt til 1 ( $n=2$  individuelle forsøk).

### 3.5 Korrelasjonsanalyse

Kliniske data ble mottatt fra SSO i Tønsberg. Det ble gjennomført en korrelasjonsanalyse for å undersøke om *in vitro*-dataene fra substratoksidasjonsforsøkene og beregnede parametere for metabolsk fleksibilitet korrelerte med relevante kliniske data (tabell 3.1).

Korrelasjonskoeffisienten varierer fra +1 til -1. Hvis koeffisienten er null er variablene ikke relatert. Pearson korrelasjon blir i stor grad påvirket av avvikende verdier (outliers), ulik varians, ikke-normalitet og ikke-linearitet, derfor ble Spearman's rho, en ikke-parametrisk test, benyttet som korrelasjonsanalyse i tillegg til Pearson korrelasjon. Korrelasjonene er utført på alle de tre donorgruppene samlet, uavhengig av forbehandling og akuttmedium-betingelser. Korrelasjonene mellom basaldata (fettsyreoksidasjon, fettsyreopptak og fraksjonell oksidasjon) og kliniske data bekreftet i stor grad resultatene fra undersøkelsene av fettsyremetabolismen til de tre donorgruppene vist ovenfor (3.2.1). Fettsyreoksidasjon viste

for eksempel relativt sterke korrelasjoner med både KMI og fastende triacylglycerol (TAG). Det samme gjaldt for fettsyreopptak som også viste korrelasjon med både KMI og fastende TAG (tabell 3.1). De sterkeste korrelasjonene ble funnet mellom adapterbarhet og fastende TAG-nivå ( $r^2 = -0,38$  og  $\rho = -0,44$ ), mellom suppressibilitet og HbA1c-verdier ( $r^2 = 0,40$  og  $\rho = 0,41$ ) og delvis fastende glukosenivå ( $r^2 = 0,37$ ) og i den ene korrelasjonstesten (Spearman's rho) mellom substratregulert fleksibilitet og både KMI ( $\rho = -0,40$ ) og fastende TAG ( $\rho = -0,39$ ).

**Tabell 3.1 Korrelasjonsanalyse av in vitro-data mot kliniske data.** Korrelasjonsanalysen er basert på data fra substratoksidasjonsforsøk på alle de tre donorgruppene samlet, uavhengig av forbehandling og akuttmedium-betingelser. Negative verdier svarer til negative korrelasjoner, positive verdier svarer til positive korrelasjoner. Tosidig t-test er utført for å finne p-verdien til korrelasjonskoeffisientene, \* = signifikant ved  $\alpha = 0,05$ , \*\* = signifikant ved  $\alpha = 0,01$

	Pearson korrelasjon		Spearman's rho	
	$r^2$	p-verdi	$\rho$	p-verdi
<b>Oksidasjon (CO<sub>2</sub>)</b>				
- Alder	-0,18	p = 0,003**	-0,12	p = 0,053
- KMI	0,32	p = 0,000**	0,30	p = 0,000**
- Fastende glukose	0,15	p = 0,017*	0,20	p = 0,001**
- HbA1c	0,18	p = 0,021*	0,15	p = 0,055
- Fastende triacylglycerol	0,17	p = 0,005**	0,27	p = 0,000**
<b>Opptak (CO<sub>2</sub>+CA)</b>				
- KMI	0,25	p = 0,000**	0,24	p = 0,000**
- Fastende triacylglycerol	0,17	p = 0,006**	0,24	p = 0,000**
<b>Fraksjonell oksidasjon</b>				
- Alder	-0,19	p = 0,002**	-0,10	p = 0,101
- KMI	0,27	p = 0,000**	0,21	p = 0,001**
- Fastende glukose	0,17	p = 0,007**	0,21	p = 0,001**
- HbA1c	0,20	p = 0,012*	0,16	p = 0,051
- Fastende triacylglycerol	0,17	p = 0,006**	0,18	p = 0,004**
<b>Adapterbarhet</b>				
- Fastende glukose	-0,23	p = 0,134	-0,33	p = 0,026*
- Fastende triacylglycerol	-0,38	p = 0,010**	-0,44	p = 0,003**
<b>Suppressibilitet</b>				
- Fastende glukose	0,37	p = 0,013*	0,26	p = 0,085
- HbA1c	0,40	p = 0,030*	0,41	p = 0,025*
<b>Substratregulert fleksibilitet</b>				
- KMI	-0,25	p = 0,067	-0,40	p = 0,003**
- Fastende triacylglycerol	-0,23	p = 0,100	-0,39	p = 0,003**

## 4. Diskusjon

Å sammenligne energimetabolismen i myotuber fra normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2-diabetes (EO-T2D) har så vidt vi kjenner til ikke tidligere vært utført. Det var derfor interessant å kartlegge fettsyre- og glukosemetabolismen til myotubene fra de tre donorgruppene ved hjelp av substratoksidasjonsforsøk. Videre var det interessant å beregne og sammenligne metabolsk fleksibilitet for de tre donorgruppene på bakgrunn av resultatene fra substratoksidasjonsforsøkene, for å få et bilde av hvilken effekt ekstrem overvekt og type 2-diabetes har på de tre *in vitro* parametrene for metabolsk fleksibilitet. Vi ønsket også å undersøke uttrykk av gener knyttet til fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak, for å se dette i sammenheng med resultatene fra substratoksidasjonsforsøkene. Ettersom Akt/PKB i flere studier er linket til aktiviteten i insulinsignaleringskaskaden, ønsket vi også å måle mengden fosforylert Akt/PKB som respons på insulinstimulering i de tre donorgruppene.

### 4.1 Klassifisering og karakterisering av donorer

De ekstremt overvektige donorene ble klassifisert som normal glukosetolerante eller med etablert T2D på bakgrunn av antidiabetisk behandling (tidligere diagnostisert T2D) eller en blodprøve som avdekket fastende blodglukose. Blodprøven ble tatt under første konsultasjon ved senter for sykelig overvekt (SSO) i Tønsberg. Muskelbiopsien som ble benyttet til isolering av satellittceller ble hentet ut under bariatrisk kirurgi. Perioden fra pasientene, som er benyttet som donorer i denne oppgaven, ble vurdert for bariatrisk kirurgi til inngrepet fant sted varierte fra 1-6 år. Etter at en pasient er vurdert og funnet kvalifisert for bariatrisk kirurgi ved SSO i Tønsberg, får pasienten tildelt en diett som skal følges i 6-7 uker før operasjon. Dette er ønskelig for at vekten skal være lavest mulig på operasjonsdagen ettersom dette reduserer risikoen for komplikasjoner under operasjon. I følge informasjonsbrev til pasienten fra SSO i Tønsberg kan pasientene gå ned 1-2 kg/uke dersom de holder seg til dietten. Vektnedgang har i mange studier vist å redusere insulinresistens. Pasientene som er benyttet som donorer i denne oppgaven hadde ved første konsultasjon ved SSO i Tønsberg en gjennomsnitts KMI på 48,4 for EO-NGT og 46,1 for EO-T2D. Det er dermed lite trolig at de ville gått ned tilstrekkelig i vekt til at de ikke hadde T2D på



operasjonstidspunktet, men alvorligheten av T2D kan ha blitt noe bedret i løpet av årene de har ventet på operasjon. Det er i tillegg vanskelig å være sikker på om de som ble klassifisert som normal glukosetolerante fortsatt befinner seg i denne gruppen. Dette både på grunn av klassifiseringsmetoden som kun utelukker T2D, ikke konstaterer NGT, men også på grunn av at pasientene har levd med ekstrem overvekt i flere år etter at klassifiseringen ble gjort med de metabolske påkjenninger dette medfører. Donorkarakteristika viser imidlertid statistisk signifikant høyere fastende glukose hos EO-T2D-donorene i forhold til både EO-NGT-donorene og NV-kontrolldonorene, dette tyder på at klassifiseringen kan stemme. HbA1c hos EO-T2D-donorene ligger også høyere i forhold til EO-NGT-donorene, men ettersom EO-T2D-donorene behandles for T2D kan ikke HbA1c-verdiene direkte sammenlignes. Gjennomsnittsverdien for HbA1c hos EO-NGT ligger imidlertid innenfor referanseområde noe som også peker i den retning at klassifiseringen av donorene kan stemme. Gjennomsnittsverdien for HbA1c hos EO-T2D ligger høyere enn anbefalt behandlingsmål for T2D, noe som indikerer at antidiabetika behandlingen ikke er optimalisert for disse donorene. EO9 har en fastende glukoseverdi som er relativt høy (7,2 mmol/L) i forhold til klassifiseringen NGT, dette kan skyldes at blodprøven ikke er tatt fastende. Pasientens langtidsblodsukker (HbA1c) ligger på 6,3 % og gir dermed ingen klar indikasjon på at denne pasienten kan ha T2D. Blodprøven for klassifisering av pasienten ble tatt i 2004 mens operasjonen og uttak av biopsi ikke ble gjennomført før i 2010. Det kan dermed ha skjedd en del med pasientens kliniske situasjon i mellomtiden, men dette blir kun spekulasjoner. EO11 har en relativt lav fastende glukoseverdi i forhold til klassifiseringen T2D. Tilgjengelige kliniske data kan tyde på at denne donoren har utviklet T2D i påvente av operasjon (2 år), høy alder, lett forhøyet nivå av insulin i blodprøven ved første konsultasjon, samt familiehistorikk med både fedme og diabetes peker mot denne konklusjonen. I forhold til alder finnes det ingen statistisk signifikante forskjeller mellom de tre donorgruppene. EO-NGT ser imidlertid ut til å være litt yngre enn de to andre gruppene, det kan selvfølgelig diskuteres om disse donorene vil komme over i EO-T2D-gruppen når de blir eldre, men dette blir kun spekulasjoner ettersom jeg ikke har undersøkt dette i denne oppgaven. For tolkning og diskusjon av resultatene i denne oppgaven benyttes de klassifiseringer som er blitt oppgitt av SSO i Tønsberg.

## 4.2 Fettsyremetabolisme

Tidligere studier i skjelettmuskelceller (myotuber) har observert redusert fettsyreoksidasjon hos overvektige og type 2-diabetikere [12, 13, 64]. I resultatene presentert i denne oppgaven så det ut til å være en fedmeeffekt hvor begge donorgruppene med ekstrem overvekt (EO) hadde både høyere fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon enn de normalvektige (NV) donorene. Korrelasjonsanalysen viste også at basaldata for både fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak korrelerte positivt med kliniske verdier for både KMI og fastende triacylglycerol (TAG). Den fraksjonelle fettsyreoksidasjonen så imidlertid ut til å være tilnærmet lik i alle tre gruppene. Dette tyder på at myotubene fra de tre donorgruppene har tilsvarende mitokondrieffektivitet for fettsyremetabolisme, men at kapasiteten til myotubene fra de to ekstremt overvektige donorgruppene ligger på et høyere nivå. Resultatene kan tyde på at cellene hentet fra de to gruppene med ekstremt overvektige donorer har tilpasset seg et miljø med eksponering for høyere fettsyrekonsentrasjoner, og statistisk signifikant høyere nivåer av fastende TAG indikerer at det er en høyere fettsyrekonsentrasjon i plasma hos EO-donorene. Eventuelt kan de to gruppene med EO-donorer ha et annet utgangspunkt enn NV-donorene med tanke på fettsyremetabolisme. Uansett årsak ser det ut til at dette fører til at hele fettsyremetabolismen til de to EO-donorgruppene har fått en høyere kapasitet. Det var ingen forskjeller mellom myotubene fra de ekstremt overvektige med T2D og de ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse. Dette kan skyldes at dersom cellene er tilpasset, genetisk eller epigenetisk, en høyere fettsyrekonsentrasjon er muligens ikke 100  $\mu\text{M}$  OA stor nok fettsyrebelastning til å få frem forskjellene mellom myotuber fra de to ekstremt overvektige donorgruppene. En annen mulig årsak kan være at forskjellene mellom ekstremt overvektige T2D celler og celler fra donorer med normal glukosetoleranse ikke kan avdekkes *in vitro*, dette indikerer at det ikke skjer noen endringer som følge av T2D i skjelettmuskelcellene som bibeholdes når cellene tas ut av sitt interne miljø. Det er i midlertidig vist i tidligere *in vitro*-studier at muskelceller fra T2D har lavere fettsyreoksidasjon og tendens til høyere fettsyreopptak enn overvektige kontrollceller [12, 65-67]. Det at vi fant en forskjell mellom myotubene fra normalvektige og de to gruppene med ekstremt overvektige donorer *in vitro* kan, som nevnt over, tyde på at cellene fra de to ekstremt overvektige donorgruppene har gjennomgått en epigenetisk endring, som følge av ekstrem overvekt, og slik blitt tilpasset den høye fettsyrekonsentrasjonen *in vivo*. Skjelettmuskelcellene fra EO-donorgruppene kan også ha et spesielt genetisk uttrykk som er

forskjellig fra normalvektige i utgangspunktet, som kan medvirke til utvikling av ekstrem overvekt. Hancock et al. [6] undersøkte effekter av høyfettdiett i rotter *in vitro*. De avdekket økt mengde av mitokondrieenzymproteiner og økt oksideringskapasitet i muskelcellene fra forsøksdyrene foret med høyfettdiett i forhold til kontrolldyr. Samtidig ble det observert utvikling av insulinresistens hos rottene på høyfettdiett. Fettsyrer er endogene ligander for PPAR $\delta$ . Hancock et al. [6] fant økte nivåer av PPAR $\delta$ , som regulerer CPT 1B-ekspresjon i skjelettmuskelceller, hos rotter foret med høyfettdiett i forhold til kontrolldyr. Økt nivå av PPAR $\delta$  kan dermed stå bak den økte fettsyreoksidasjonen i cellene fra de to EO-donorgruppene benyttet i denne oppgaven. Ved undersøkelse av mRNA-ekspresjonen av CPT 1B og CD36 i denne oppgaven så det ut til å være små eller ingen forskjeller i uttrykket av CPT 1B hos de tre donorgruppene. De to EO-donorgruppene kan ha økt mengde CPT 1B-protein, uten at dette kom til uttrykk ved undersøkelse av mRNA-ekspresjon. Protein-nivå kan øke via andre mekanismer enn økt transkripsjon, for eksempel via posttranskripsjonale mekanismer. Det var tendens til forskjell mellom EO-T2D og EO-NGT i uttrykket av CPT 1B, dette kan tyde på at det finnes forskjeller mellom de to EO-donorgruppene også *in vitro* som jeg ikke har klart å detektere med substratoksidasjonsmetoden under de betingelser jeg valgte å teste. Uttrykket av CD36 så ut til å være relativt likt for alle tre donorgruppene. Dette kan indikere at cellene fra de to EO-donorgruppene tar opp fettsyrer via andre mekanismer, for eksempel diffusjon gjennom plasmamembranen, i tillegg til via CD36. Kun tre donorer per gruppe fører til at jeg ikke kan trekke noen klar konklusjon fra disse dataene.

Forbehandling med oljesyre (OA) ble gjennomført for å fungere som fettsyrekontroll, OA er brukt til dette formålet i tidligere studier [50-52]. Forbehandling med OA hadde små eller ingen effekter på fettsyreoksidasjon, fettsyreopptak eller metabolsk fleksibilitet i celler fra de tre donorgruppene. Eikosapentaensyre (EPA) har i tidligere studier ført til økt fettsyreopptak og økt metabolsk fleksibilitet i myotuber fra normalvektige donorer [43, 51]. I motsetning til dette fant jeg at forbehandling med EPA ikke hadde tydelig effekt på verken fettsyreopptak eller fettsyreoksidasjon i myotuber fra noen av donorgruppene. Undersøkelsene av genetisk uttrykk av CPT 1B og CD36 viste imidlertid at EPA økte mRNA-ekspresjonen av begge genene i alle tre donorgruppene. Dette kan tyde på at EPA har størst effekt på gennivå, og andre effekter som er observert kan muligens ses på som sekundæreffekter til dette.

Forbehandling med høy glukose (20 mM) i 4 døgn [61] for å simulere kronisk hyperglykemi, førte ikke til noen synlige effekter på fettsyremetabolismen eller den metabolske

fleksibiliteten. I tidligere studier er det funnet at kronisk hyperglykemi førte til økt lipogenese, økt intracellulær triacylglycerol (TAG) akkumulering, redusert fettsyreoksidasjon og nedsatt metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskelceller fra NV-donorer [55, 56]. Grunnen til at vi ikke fikk frem disse effektene i resultatene presentert i denne oppgaven kan skyldes store individuelle forskjeller mellom donorene.

### 4.3 Glukosemetabolisme

Tidligere studier har vist at fedme er sterkt assosiert med utvikling av insulinresistens (IR) og T2D [21]. Det er i *in vivo*-studier observert nedsatt glukoseopptak, glykogensyntese og glukoseoksidasjon i skjelettmuskel i forbindelse med IR [68, 69]. I *in-vitro*-studier er det imidlertid observert økt glukoseopptak og glukoseoksidasjon, men nedsatt insulinrespons i myotuber fra overvektige og pasienter med T2D i forhold til NV-donorer [70, 71].

Resultatene presentert i denne oppgaven viste en trend til høyere glukoseoksidasjon i myotubene fra de to EO-gruppene i forhold til celler fra de NV-donorene. Dette kan tyde på at glukosemetabolismen i likhet med fettsyremetabolismen er oppregulert for cellene fra de to gruppene med EO-donorer. Det så ut som om cellene fra EO-NGT-donorene oksiderte noe mer glukose enn cellene fra EO-T2D, dette kan forklares med at cellene fra EO-T2D-donorene tok opp mindre glukose og oksiderte dermed også mindre enn EO-NGT. Ettersom spredningen på dataene er relativt stor, vil det kreves flere forsøk for å kunne trekke en endelig konklusjon. Det ble ikke observert insulineffekter på glukosemetabolismen i noen av donorgruppene. Dette skyldes antagelig at myotuber dyrket etter protokollen benyttet i denne oppgaven hadde svært lite GLUT4. GLUT1 derimot er godt uttrykt og høyt basalopptak av glukose overskygger antageligvis eventuelle forskjeller i insulinstimulert glukoseopptak [E.T. Kase personlig meddelelse].

Suppressibilitet forårsaket av akutt fettsyre på glukoseoksidasjonen ble undersøkt hos en EO-T2D-donor i denne oppgaven, suppressjon ble observert og var tilstede både med og uten tilsatt avkoblermolekyl. I en tidligere studie [56] hvor det samme ble utført på NV-donorer fikk man ikke frem suppressjonen uten tilsetning av avkoblermolekyl. Det er vanskelig å trekke slutninger ettersom resultatene kun baserer seg på en donor, dette kan dermed være en tilfeldighet, men det kan også være tilfellet at skjelettmuskelcellene fra EO-donorene foretrekker å oksidere fett og at de dermed har en sterkere tendens enn NV-donorer til å

undertrykke glukoseoksidasjon når fettsyre er tilstede. Det kan være interessant å utføre denne typen forsøk på flere av donorene for å undersøke om fettsyre-suppresjonen på glukoseoksidasjonen er reell og om det finnes gruppeforskjeller mellom EO-NGT, EO-T2D og NV.

Studier (se 1.2.1) har ikke vist stabilt forandret aktivitet av Akt i overvektige og individer med T2D, det er derfor uklart hvilken rolle proteinet spiller for glukosemetabolismen og insulinsignaleringsen i en IR-situasjon. Resultater vist i denne oppgaven er basert på et lite datamateriale, så dette begrenser hvilke konklusjoner som kan trekkes. Det er imidlertid en trend til lavere insulinstimulert Akt-fosforylering hos de to EO-donorgruppene. Dette gjør at jeg ikke kan utelukke at det finnes en forskjell mellom myotubene fra de tre donorgruppene med hensyn på insulinstimulert Akt-fosforylering og muligens da også insulinfølsomhet. Det er i midlertidig nødvendig å utføre flere forsøk for å validere resultatene.

## 4.4 Metabolsk fleksibilitet

Metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskulatur reflekterer muskelens evne til å tilpasse seg til ulike energisubstrater i ulike konsentrasjoner. Alle de tre *in vitro*-parametrene var lavere for de to EO-donorgruppene enn for NV-kontrollene. Tidligere studier har vist positiv korrelasjon mellom *in vitro*-adapterbarhet og *in vivo*-metabolsk fleksibilitet og insulinsensitivitet [39]. Lavere adapterbarhet for de to EO-donorgruppene reflekterer dermed dårligere evne til å tilpasse seg økende konsentrasjon av fettsyrer og, i følge korrelasjonen, lavere insulinsensitivitet. Ettersom begge EO-donorgruppene hadde en høyere fettsyremetabolisme enn NV-kontroller mens adapterbarheten var lavere, kan disse resultatene tyde på at skjelettmuskelceller fra de to EO-donorgruppene behandler fettsyrer på en annen måte enn skjelettmuskelceller fra normalvektige. Det hadde derfor vært interessant å undersøke lipiddråper i myotubene fra de to EO-donorgruppene med levende bildebehandling (live imaging) for å se om mønstre og mengde av lipiddråper er annerledes enn i myotubene fra normalvektige. I tillegg hadde det vært interessant å undersøke distribusjon av fettsyrene intracellulært for å se om det er noen forskjeller blant gruppene i forhold til hvor mye de lagrer av fettsyrene og i hvilke bestanddeler fettsyrene lagres.

Suppressibilitet i begge EO-gruppene var lavere enn i NV-kontrollene, dette tyder på at akutt tilsetning av glukose hadde mindre påvirkning på fettsyreoksidasjonen i muskelceller fra de to EO-donorgruppene sammenlignet med muskelceller fra normalvektige personer. En teori er derfor at de to EO-donorgruppene har dårligere tilpasningsevne i forhold til endringer i type og konsentrasjon av energisubstrat. Det så ut som om cellene fra de to EO-donorgruppene foretrakk å oksidere fett ved de betingelser som ble benyttet i denne oppgaven. En mulig hypotese er at cellene fra begge EO-donorene var blitt eksponert for et miljø med økt fettsyre-tilgjengelighet, fettsyre var *in vivo* den enkleste tilgjengelige energikilden. Ettersom endringen i valg av energisubstrat så ut til å vedvare *in vitro* kunne dette tyde på epigenetiske endringer i skjelettmuskelcellene fra de to EO-donorene. Eventuelt at de to EO-donorgruppene hadde et annerledes genetisk uttrykk enn NV-kontrollene i utgangspunktet. Det så i midlertidig ut til at EO-T2D cellene utviste tendens til noe høyere suppressibilitet enn EO-NGT cellene. Dette tyder på at glukose undertrykket fettsyreoksidasjonen i større grad hos myotubene fra EO-T2D-donorene i forhold til cellene fra EO-NGT-donorene, dette er vanskelig å forklare ettersom det ikke er store forskjeller mellom de to EO-gruppene verken med hensyn på fettsyreoksidasjon eller fettsyreopptak uavhengig av fettsyrekonsentrasjon og nærvær av akutt glukose.

Substratregulert fleksibilitet var lavere hos myotubene fra de to EO-donorgruppene enn hos myotubene fra de normalvektige donorene, dette kan tyde på at begge EO-donorgruppene dårligere tilpasser seg endringer i tilgjengelig energisubstrat i forhold til NV-kontroller.

Det gjenstår imidlertid å avgjøre om den observerte metabolske infleksibiliteten hos de to EO-donorgruppene i forhold til NV-kontrolldonorene er en medvirkende faktor til utvikling av, eller er forårsaket av den ekstreme overvekten hos disse pasientene.

EPA tenderte til å øke alle de tre parametrene for metabolsk fleksibilitet, i cellene fra alle tre donorgruppene. Ettersom OA ikke utviste betydelige effekt på cellenes metabolske fleksibilitet ser det ut til at dette er en EPA-effekt og ikke en generell fettsyreeffekt. Teorier for EPAs effekt på metabolsk fleksibilitet kan i følge tidligere studier [43] være at inkorporering av  $\omega$ -3-fettsyrer i ulike membraner intracellulært, blant annet mitokondriemembranen, kan endre strukturen og dynamikken til membranene. I tillegg kan den økte metabolske fleksibiliteten skyldes at EPA økte transkripsjonen av gener som er viktige for fettsyremetabolismen; CPT 1B og CD36.

De normalvektige donorene viste den største forandringen i parametrene for metabolsk fleksibilitet som følge av EPA-forbehandling, dette kan komme av at disse donorene muligens lettere lar seg påvirke av ytre miljøfaktorer.

Korrelasjonsanalysen viste at de tre parametrene for metabolsk fleksibilitet korrelerte med kliniske data. For eksempel var det en relativt sterk negativ korrelasjon mellom adapterbarhet og fastende TAG-nivå. Samtidig fant jeg at suppressibilitet korrelerte positivt med både HbA1c-verdier og fastende glukoseverdier. Substratregulert fleksibilitet viste negativ korrelasjon med både KMI og fastende TAG-verdier i den ene korrelasjonstesten. Disse korrelasjonene er svært interessante ettersom de tyder på at parametrene som benyttes *in vitro* for å beskrive metabolsk fleksibilitet korrelerer med og dermed gjenspeiler relevante parametre som sier noe om *in vivo*-situasjonen. Slike *in vitro-in vivo*-korrelasjoner er observert også i tidligere studier [39, 48], noe som kan indikere at de tre parametrene benyttet for å undersøke metabolsk fleksibilitet i denne oppgaven reflekterer *in vivo*-situasjonen på tilfredsstillende måte.

## 5. Konklusjon

Resultatene presentert i denne oppgaven indikerer høyere fettsyre- og glukosemetabolisme, men nedsatt metabolsk fleksibilitet *in vitro* i myotuber fra ekstremt overvektige donorer i forhold til myotuber fra normalvektige kontrolldonorer. Dette kan tyde på at myotubene fra ekstremt overvektige donorer enten har gjennomgått en epigenetisk endring som følge av den ekstreme overvekten eller at de er genetisk forskjellig fra normalvektige kontroller i utgangspunktet. Resultatene gir en indikasjon på at det kan være forskjeller mellom de to ekstremt overvektige donorgruppene, men ved hjelp av metodene og betingelsene benyttet i denne oppgaven har jeg ikke klart å avdekke statistisk signifikante forskjeller. Resultatene presentert i denne oppgaven kan ikke i seg selv besvare spørsmålet om hvorfor noen pasienter med ekstrem overvekt er beskyttet mot utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes. Resultatene gir imidlertid en indikasjon på hvor det kan være fornuftig å fortsette letingen etter forskjeller. Å belaste myotubene med en høyere fettsyrekonsentrasjon under substratoksidasjonsforsøk, å undersøke mRNA-ekspresjon for flere gener involvert i fettsyre- og glukosemetabolisme, undersøke proteinuttrykk av CPT 1B og CD36 og å undersøke suppresjon av glukoseoksidasjonen i nærvær av fettsyre kan være noen tiltak for å få frem eventuelle forskjeller mellom de to ekstremt overvektige donorgruppene.



## Kildeliste

1. WHO. *World health organization*. Fact sheet Obesity and overweight 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. WHO, *Overweight and obesity are defined as "abnormal or excessive fat accumulation that may impair health"*, WHO. p. <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/en/>.
3. Sverre Mæhlum, K.M., Bård Kulseng, Serene Tonstad, Charlotte Buhl, Inger Arctander, Urd Andestad, Mette Svendsen, Per Møller Axelsen, Anita A. Aandland, *Forebygging, utredning og behandling av overvekt og fedme hos voksne. Nasjonale retningslinjer for primærhelsetjenesten*, Helsedirektoratet, Editor. 2010, Helsedirektoratet: Oslo.
4. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Obesity-related derangements in metabolic regulation*. Annual Review of Biochemistry, 2006. **75**: p. 367-401.
5. Smyth, S. and A. Heron, *Diabetes and obesity: The twin epidemics*. Nature Medicine, 2006. **12** (1): p. 75-80.
6. Hancock, C.R., et al., *High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105** (22): p. 7815-7820.
7. Venables, M.C. and A.E. Jeukendrup, *Physical inactivity and obesity: Links with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus*. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2009. **25** (SUPPL. 1): p. S18-S23.
8. Duvnjak, L. and M. Duvnjak, *The metabolic syndrome - an ongoing story*. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society, 2009. **60 Suppl 7**: p. 19-24.
9. Sharma, A.M. and V.T. Chetty, *Obesity, hypertension and insulin resistance*. Acta Diabetologica, 2005. **42** (SUPPL. 1): p. S3-S8.
10. legemiddelhåndbok, F.f.u.a.N., *Norsk legemiddelhåndbok*, F.f.u.a.N. legemiddelhåndbok, Editor. 2011: Oslo.
11. IDF, *IDF Diabetes Atlas*, in *Diabetes and Impaired Glucose Tolerance*, I.D. Federation, Editor, International Diabetes Federation.
12. Gaster, M., et al., *Reduced Lipid Oxidation in Skeletal Muscle from Type 2 Diabetic Subjects May Be of Genetic Origin: Evidence from Cultured Myotubes*. Diabetes, 2004. **53** (3): p. 542-548.
13. Kelley, D.E., et al., *Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51** (10): p. 2944-2950.
14. Zierath, J.R. and A. Krook, *Resistens mot insulin i skelettmuskel på molekylär nivå*. Lakartidningen, 2010. **107** (45): p. 2802-2805.
15. Aschner, P., *Metabolic syndrome as a risk factor for diabetes*. Expert Review of Cardiovascular Therapy, 2010. **8** (3): p. 407-412.
16. Shaw J.E., S.R.W., ed. *Prevention of Type 2 Diabetes*. Contemporary Diabetes: Diabetes and Exercise, ed. R. et.al. 2009, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media.
17. Reaven, G.M., *Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. 1988. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 1988. **13** (1): p. 65; discussion 64, 66.

18. Beck-Nielsen, H. and L.C. Groop, *Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Journal of Clinical Investigation, 1994. **94** (5): p. 1714-1721.
19. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414** (6865): p. 799-806.
20. Khan, A.H. and J.E. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45** (11): p. 1475-1483.
21. Choi, K. and Y.B. Kim, *Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes*. Korean Journal of Internal Medicine, 2010. **25** (2): p. 119-129.
22. Schaffer, J.E., *Lipotoxicity: When tissues overeat*. Current Opinion in Lipidology, 2003. **14** (3): p. 281-287.
23. UCSF, *Type 2 Diabetes: Insulin Resistance*, in *The University of California, San Francisco*, UCSF.
24. Toledo, F.G.S. and D.E. Kelley, *Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of insulin resistance associated with obesity, diabetes, and aging*. Current Opinion in Endocrinology and Diabetes, 2005. **12** (2): p. 157-162.
25. Opie, L.H. and P.G. Walfish, *Plasma free fatty acid concentrations in obesity*. The New England journal of medicine, 1963. **268**: p. 757-760.
26. Kraegen, E.W., G.J. Cooney, and N. Turner, *Muscle insulin resistance: a case of fat overconsumption, not mitochondrial dysfunction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105** (22): p. 7627-7628.
27. Bell, J.A., et al., *Lipid partitioning, incomplete fatty acid oxidation, and insulin signal transduction in primary human muscle cells: effects of severe obesity, fatty acid incubation, and fatty acid translocase/CD36 overexpression*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2010. **95** (7): p. 3400-3410.
28. Ritov, V.B., et al., *Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2010. **298** (1): p. E49-E58.
29. He, J., S. Watkins, and D.E. Kelley, *Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity*. Diabetes, 2001. **50** (4): p. 817-823.
30. Rasmussen, B.B., et al., *Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle*. Journal of Clinical Investigation, 2002. **110** (11): p. 1687-1693.
31. Bjornholm, M., et al., *Insulin Receptor Substrate-1 Phosphorylation and Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Skeletal Muscle From NIDDM Subjects After In Vivo Insulin Stimulation*. Diabetes, 1997. **46**(3): p. 524-527.
32. Bruce Alberts, D.B., Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Essential cell biology*. Second edition ed. 2004, New York: Garland Science.
33. Ehehalt, R., et al., *Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts)*. BMC cell biology, 2008. **9**: p. 45.
34. Ehehalt, R., et al., *Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane - Lipid rafts and fatty acid transport proteins*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006. **284** (1-2): p. 135-140.
35. Mashek, D.G. and R.A. Coleman, *Cellular fatty acid uptake: The contribution of metabolism*. Current Opinion in Lipidology, 2006. **17** (3): p. 274-278.

36. Martin, S. and R.G. Parton, *Lipid droplets: A unified view of a dynamic organelle*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006. **7** (5): p. 373-378.
37. Murphy, S., S. Martin, and R.G. Parton, *Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2009. **1791** (6): p. 441-447.
38. Ibrahimi, A., et al., *Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274** (38): p. 26761-26766.
39. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115** (7): p. 1934-1941.
40. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1**: p. 785-789.
41. Sidossis, L.S. and R.R. Wolfe, *Glucose and insulin-induced inhibition of fatty acid oxidation: The glucose-fatty acid cycle reversed*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 1996. **270** (4 33-4): p. E733-E738.
42. Gaster, M., *Metabolic flexibility is conserved in diabetic myotubes*. Journal of Lipid Research, 2007. **48** (1): p. 207-217.
43. Hessvik, N.P., et al., *Metabolic switching of human myotubes is improved by n-3 fatty acids*. Journal of Lipid Research, 2010. **51** (8): p. 2090-2104.
44. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: A reexamination*. Diabetes, 2000. **49** (5): p. 677-683.
45. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: Timing and flexibility are everything*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115** (7): p. 1699-1702.
46. Corpeleijn, E., et al., *Impaired skeletal muscle substrate oxidation in glucose-intolerant men improves after weight loss*. Obesity, 2008. **16** (5): p. 1025-1032.
47. Marra, M., et al., *Fasting respiratory quotient as a predictor of weight changes in non-obese women*. International Journal of Obesity, 1998. **22** (6): p. 601-603.
48. Corpeleijn, E., et al., *Oxidation of intramyocellular lipids is dependent on mitochondrial function and the availability of extracellular fatty acids*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2010. **299** (1): p. E14-E22.
49. Gao, D., H.R. Griffiths, and C.J. Bailey, *Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6 myotubes*. British Journal of Nutrition, 2009. **102** (11): p. 1557-1563.
50. Hu, F.B.M.D.P. and W.C.M.D.D. Willett, *Optimal Diets for Prevention of Coronary Heart Disease*. JAMA, 2002. **288**(20): p. 2569-2578.
51. Aas, V., et al., *Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells*. Journal of Lipid Research, 2006. **47** (2): p. 366-374.
52. Woodside, J.V., M.C. McKinley, and I.S. Young, *Saturated and trans fatty acids and coronary heart disease*. Current atherosclerosis reports, 2008. **10** (6): p. 460-466.
53. Flachs, P., et al., *Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism*. Clinical science (London, England : 1979), 2009. **116** (1): p. 1-16.
54. Richter, E.A., B.F. Hansen, and S.A. Hansen, *Glucose-induced insulin resistance of skeletal-muscle glucose transport and uptake*. Biochemical Journal, 1988. **252** (3): p. 733-737.

- 
55. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: Effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Acta Physiologica Scandinavica, 2005. **183 (1)**: p. 31-41.
  56. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycemia reduces substrate oxidation and impairs metabolic switching of human myotubes*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 2011. **1812 (1)**: p. 94-105.
  57. Olav Sand, Ø.V.S., Egil Haug, Med ill. Kari C. Toverud, *Menneskets fysiologi*. 1 ed. Vol. 3. 2005: Gyldendal Norske Forlag AS.
  58. Park, K.S., et al., *FCCP depolarizes plasma membrane potential by activating proton and Na<sup>+</sup> currents in bovine aortic endothelial cells*. Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 2002. **443 (3)**: p. 344-352.
  59. Blau, H.M. and C. Webster, *Isolation and characterization of human muscle cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981. **78 (9 II)**: p. 5623-5627.
  60. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. Apmis, 2001. **109 (11)**: p. 735-744.
  61. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells*. Diabetologia, 2004. **47 (8)**: p. 1452-1461.
  62. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. Journal of Lipid Research, 2007. **48 (4)**: p. 961-967.
  63. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72 (1-2)**: p. 248-254.
  64. Kase, E.T., et al., *Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway*. Diabetes, 2005. **54 (4)**: p. 1108-1115.
  65. Gaster, M., *Reduced lipid oxidation in myotubes established from obese and type 2 diabetic subjects*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **382 (4)**: p. 766-770.
  66. Bonen, A., et al., *Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport increased sarcolemmal FAT/CD36*. FASEB Journal, 2004. **18 (10)**: p. 1144-1146.
  67. Kelley, D.E., et al., *Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 1999. **277 (6 40-6)**: p. E1130-E1141.
  68. Peiris, A.N., et al., *Glucose metabolism in obesity: Influence of body fat distribution*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 67 (4) (pp 760-767), 1988.
  69. Kelley, D.E., et al., *The effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity on glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle*. Journal of Clinical Investigation. 97 (12) (pp 2705-2713), 1996.
  70. Gaster, M., *Insulin resistance and the mitochondrial link. Lessons from cultured human myotubes*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 2007. **1772 (7)**: p. 755-765.
  71. Nehlin JO, J.M., Rustan AC, Gaster M, *Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism*. Biogerontology, 2011.

## Appendiks

### 1. Celledyrking

#### 1.1

##### Utsåingsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I  
50 ml FCS (Foetal Calf serum)  
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml  
2,5 ml Fungizone

#### 1.2

##### Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I  
10 ml FCS (Foetal Calf serum)  
10 ml Ultrosor G  
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml  
2,5 ml Fungizone

#### 1.3

##### Differensieringsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I  
10 ml FCS (Foetal Calf serum)  
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml  
2,5 ml Fungizone  
25 pmol insulin

#### 1.4

##### SkGM-dyrkningsmedium

500 ml SkBM Basal medium  
SkGM SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (0,5 ml hEGF, 5 ml Fetuin, 0,5 ml Dexamethasone, 0,5 ml GA-1000, 5 ml BSA)  
250 µg/ml (amfotericin) Fungizone®  
200mM L-glutamin  
10000 U/ml, 10000 µg/ml Penicillin/Streptomycin

#### 1.5

##### Frysemedium (per ampulle)

0,25 ml SkGM  
0,25 ml FCS/FBS  
0,5 ml 20 % DMSO

## 2. Akuttmedier til substratoksidasjonsmetoden

### 2.1

Høy fettsyre, ingen glukose (Fg)

17,2  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]OA (1  $\mu\text{Ci/ml}$ )

82,8  $\mu\text{M}$  OA

10  $\mu\text{M}$  L-Carnitin

7,2  $\mu\text{M}$  BSA

ad. DPBS m/HEPES pH 7,3

### 2.2

Høy fettsyre, høy glukose (FG)

17,2  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]OA (1  $\mu\text{Ci/ml}$ )

82,8  $\mu\text{M}$  OA

10  $\mu\text{M}$  L-Carnitin

7,2  $\mu\text{M}$  BSA

5 mM glukose

ad. DPBS m/HEPES pH 7,3

### 2.3

Lav fettsyre, ingen glukose (fg)

5  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]OA

10  $\mu\text{M}$  L-Carnitin

2,1  $\mu\text{M}$  BSA

ad. DPBS m/HEPES pH 7,3

### 2.4

Lav fettsyre, høy glukose (fG)

5  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]OA

10  $\mu\text{M}$  L-Carnitin

2,1  $\mu\text{M}$  BSA

5 mM glukose

ad. DPBS m/HEPES pH 7,3

### 2.5

Glukose

111  $\mu\text{M}$  D- $^{14}\text{C}$  (U)]glukose (1  $\mu\text{Ci/ml}$ )

10  $\mu\text{M}$  BSA

ad. DPBS m/HEPES pH 7,3

$\pm$  100 nmol Insulin Actrapid® Penfill

2.6

DOG

100  $\mu\text{M}$  D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ DOG (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ;) )

100  $\mu\text{M}$  glukose

10  $\mu\text{M}$  BSA

ad. DPBS m/HEPES pH 7,3

$\pm$  100 nmol Insulin Actrapid® Penfill

2.7

Suppresjon av glukosemetabolisme

111  $\mu\text{M}$  D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ )

100  $\mu\text{M}$  OA

10  $\mu\text{M}$  BSA

ad. DPBS m/HEPES pH 7,3

2.8

Suppresjon av glukosemetabolisme med FCCP

111  $\mu\text{M}$  D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ )

100  $\mu\text{M}$  OA

1  $\mu\text{M}$  FCCP

10  $\mu\text{M}$  BSA

ad. DPBS m/HEPES pH 7,3

2.9

Kontroll til suppresjon av glukosemetabolisme med FCCP

111  $\mu\text{M}$  D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ )

1  $\mu\text{M}$  FCCP

10  $\mu\text{M}$  BSA

ad. DPBS m/HEPES pH 7,3

### ***3. RT-real-time-PCR***

Reaksjonsblanding (mender per prøve)

12,5  $\mu\text{l}$  SYBR Green Master mix

0,25  $\mu\text{l}$  Forward primer (tabell 2.4)

0,25  $\mu\text{l}$  Reverse primer (tabell 2.4)

9,5  $\mu\text{l}$  Nukleasefritt vann

#### 4. Westernblotting

##### 4.1

###### 2x sample

12,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH6,8

10 ml 100 % Glyserol

20 ml 10 % SDS

Justeres med dH<sub>2</sub>O opptil 50 ml

##### 4.2

###### 12 % Polyacrylamidgel (per gel)

4,36 ml destillert vann

3,25 ml 1,5 M tris-Cl pH 8,8

5,20 ml monomer løsning

130 µl SDS løsning (10 %)

65 µl ammonium persulfat (10 %)

6,5 µl TEMED

##### 4.3

###### 4 % Stacking gel (per gel)

6,10 ml destillert vann

2,50 ml 0,5 M Tris-Cl pH 6,8

1,30 ml monomer løsning

100 µl SDS løsning (10%)

50 µl ammonium persulfat (10%)

10 µl TEMED

##### 4.4

###### T-TBS

10 mM Tris

100 mM NaCl

0,05 % Tween 20

ad. destillert vann

##### 4.5

###### Blotto

5 % tørrmelk i T-TBS